

Copy for the designated Office (DO/EP)
PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2004/052293

31

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

REICHERT, Werner F.
Leica Microsystems AG
Corporate Patents + Trademarks
Department
Ernst-Leitz-Strasse 17-37
35578 Wetzlar
Germany

Date of mailing (day/month/year) 21 June 2006 (21.06.2006)	
Applicant's or agent's file reference E 0739 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2004/052293	International filing date (day/month/year) 23 September 2004 (23.09.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH
Am Friedensplatz 3
68165 Mannheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

+49 (0) 621 - 70280

Facsimile No.

+49 (0) 621 - 702810

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH
Ernst-Leitz-Strasse 17-37
35578 Wetzlar
Germany

EPO-DG 1

27. 06. 2006

TEAM 14

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

+49 (0) 621 - 70280

Facsimile No.

+49 (0) 621 - 702810

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Martine THEVENOT (Fax 338-87-20)
Facsimile No. (41-22) 338.70.80	Telephone No. (41-22) 338 9815

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference E 0739 WO	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/EP2004/052293	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23 September 2004 (23.09.2004)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 25 September 2003 (25.09.2003)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH			

<p>1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.</p> <p>In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.</p>																
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I</td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table> <p>4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).</p>	<input checked="" type="checkbox"/> Box No. I	Basis of the report	<input checked="" type="checkbox"/> Box No. II	Priority	<input type="checkbox"/> Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	<input type="checkbox"/> Box No. IV	Lack of unity of invention	<input checked="" type="checkbox"/> Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	<input type="checkbox"/> Box No. VI	Certain documents cited	<input type="checkbox"/> Box No. VII	Certain defects in the international application	<input type="checkbox"/> Box No. VIII	Certain observations on the international application
<input checked="" type="checkbox"/> Box No. I	Basis of the report															
<input checked="" type="checkbox"/> Box No. II	Priority															
<input type="checkbox"/> Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability															
<input type="checkbox"/> Box No. IV	Lack of unity of invention															
<input checked="" type="checkbox"/> Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement															
<input type="checkbox"/> Box No. VI	Certain documents cited															
<input type="checkbox"/> Box No. VII	Certain defects in the international application															
<input type="checkbox"/> Box No. VIII	Certain observations on the international application															

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. +41 22 740 14 35</p>	<p>Date of issuance of this report 27 March 2006 (27.03.2006)</p>
	<p>Authorized officer</p> <p>Yolaine Cussac</p> <p>Telephone No. +41 22 338 70 80</p>

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

REC'D 10 FEB 2005

An:

31/3

siehe Formular PCT/ISA/220

PCT
WIPO PCT

SCHRIFTLICHER BESCHIED DER INTERNATIONALEN RECHERCHENBEHÖRDE

(Regel 43bis.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr) siehe Formular PCT/ISA/210 (Blatt 2)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

siehe Formular PCT/ISA/220

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkt 2 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/052293

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

23.09.2004

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

25.09.2003

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
G02B21/00

Anmelder

LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH

1. Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- ☒ Feld Nr. I Grundlage des Bescheids
- ☒ Feld Nr. II Priorität
- ☐ Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- ☐ Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- ☒ Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Regel 43bis.1 (a)(i) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- ☐ Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- ☐ Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- ☐ Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

2. WEITERES VORGEHEN

Wird ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt, so gilt dieser Bescheid als schriftlicher Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde ("IPEA"); dies trifft nicht zu, wenn der Anmelder eine andere Behörde als diese als IPEA wählt und die gewählte IPEA dem Internationale Büro nach Regel 66.1bis b) mitgeteilt hat, daß schriftliche Bescheide dieser Internationalen Recherchenbehörde nicht anerkannt werden.

Wenn dieser Bescheid wie oben vorgesehen als schriftlicher Bescheid der IPEA gilt, so wird der Anmelder aufgefordert, bei der IPEA vor Ablauf von 3 Monaten ab dem Tag, an dem das Formblatt PCT/ISA/220 abgesandt wurde oder vor Ablauf von 22 Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft, eine schriftliche Stellungnahme und, wo dies angebracht ist, Änderungen einzureichen.

Weitere Optionen siehe Formblatt PCT/ISA/220.

3. Nähere Einzelheiten siehe die Anmerkungen zu Formblatt PCT/ISA/220.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, R

Tel. +49 89 2399-7094



Feld Nr. I Grundlage des Bescheids

1. Hinsichtlich der **Sprache** ist der Bescheid auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache erstellt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
 - ☐ Der Bescheid ist auf der Grundlage einer Übersetzung aus der Originalsprache in die folgende Sprache erstellt worden, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (gemäß Regeln 12.3 und 23.1 b)).
2. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist der Bescheid auf folgender Grundlage erstellt worden:
 - a. Art des Materials
 - ☐ Sequenzprotokoll
 - ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
 - b. Form des Materials
 - ☐ in schriftlicher Form
 - ☐ in computerlesbarer Form
 - c. Zeitpunkt der Einreichung
 - ☐ in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht
 - ☐ bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht
3. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, daß die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
4. Zusätzliche Bemerkungen:

**SCHRIFTLICHER BESCHEID DER
INTERNATIONALEN RECHERCHEBEHÖRDE**

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/052293

Feld Nr. II Priorität

1. ☐ Das folgende Dokument ist noch nicht eingereicht worden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist (Regel 43bis.1 und 66.7(a)).
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist (Regel 43bis.1 und 66.7(b)).

Daher war es nicht möglich, die Gültigkeit des Prioritätsanspruchs zu prüfen. Der Bescheid wurde trotzdem in der Annahme erstellt, daß das beanspruchte Prioritätsdatum das maßgebliche Datum ist.

2. ☐ Dieser Bescheid ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig erwiesen hat (Regeln 43bis.1 und 64.1). Für die Zwecke dieses Bescheids gilt daher das vorstehend genannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.
3. ☒ Es war nicht möglich, die Gültigkeit des Prioritätsanspruchs zu überprüfen, da der Internationalen Recherchenbehörde zum Zeitpunkt der Recherche keine Kopie des Prioritätsdokuments zur Verfügung stand (Regel 17.1). Dieser Bescheid wurde daher unter der Annahme, dass das für die Prüfung relevante Datum der beanspruchte Prioritätstag ist, erstellt.

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Regel 43bis.1(a)(i) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit	Ja: Ansprüche 11,12,14,25,26,28 Nein: Ansprüche 1-10,13,15-24,27
Erfinderische Tätigkeit	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-28
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ja: Ansprüche: 1-28 Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V.

1 Im vorliegenden Bescheid wird auf folgende Druckschriften verwiesen:

D1: OHEIM M ET AL: "MULTIPARAMETER EVANESCENT-WAVE IMAGING IN BIOLOGICAL FLUORESCENCE MICROSCOPY" IEEE JOURNAL OF QUANTUM ELECTRONICS, IEEE INC. NEW YORK, US, Bd. 38, Nr. 2, Februar 2002 (2002-02), Seiten 142-148, XP001104420 ISSN: 0018-9197

D2: FLORIAN SCHAPPER, JOSÉ TIAGO GONCALVES, MARTIN OHEIM: "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation" EUROPEAN BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 32, 3. September 2003 (2003-09-03), Seiten 635-643, XP002315233

D3: DE 101 43 481 A1 (EUROPAEISCHES LABORATORIUM FUER MOLEKULARBIOLOGIE) 20. März 2003 (2003-03-20)

D4: US-A-4 405 237 (MANUCCIA ET AL) 20. September 1983 (1983-09-20)

2 Die Prüfung der internationalen Anmeldung in Bezug auf Neuheit und Erfinderischer Tätigkeit basiert auf den folgenden Beobachtungen unter Art. 6 PCT.

2.1 **Geräteanspruch 1** ist im kennzeichnenden Teil im Form eines Methodenschritts formuliert. Es ist allerdings unklar, welchen konkreten strukturellen Merkmale mit dieser Formulierung definiert werden sollen.

2.2 **Anspruch 6** definiert, dass "der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist". Hierbei wird das Gegenstand durch seine spätere Verwendung definiert. Da allerdings hierbei Eigenschaften der Probe eine wesentliche Rolle spielen, die nicht Teil des Mikroskops ist, ist unklar, welche konkreten strukturellen Merkmale des Mikroskops dadurch definiert werden sollen. Für die Prüfung wird angenommen, dass die beiden Beleuchtungslichtstrahlen unterschiedliche Wellenlängen besitzen.

2.3 Ein entsprechender Einwand ergibt sich auch für den **Anspruch 7**.

2.4 **Anspruch 1** definiert Beleuchtungslichtstrahlen, ohne jedoch konkrete Mittel

zu spezifizieren, die diese Lichtstrahlen erzeugen.

3 UNABHÄNGIGER ANSPRUCH 1

- 3.1 Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand des **Anspruchs 1** nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT ist.

Druckschrift **D1** offenbart ein Mikroskop (Zusammenfassung und Figur 3A-C), mit

- einem ersten und einem zweiten Beleuchtungsstrahl (Figur 3B und Bildunterschrift), wobei
- der erste und der zweite Beleuchtungsstrahl die Probe evaneszent beleuchten (Figur 3B und Bildunterschrift).

Daher besitzt das Mikroskop aus **D1** alle strukturellen Merkmale des **Anspruchs 1**, weshalb dessen Gegenstand nicht als neu im Sinne des Art. 33(2) PCT angesehen werden kann.

- 3.2 Auch im Lichte der vom Anmelder zitierten Druckschriften **D2** und **D3** erscheint der Gegenstand des **Anspruchs 1** vorweggenommen (Art. 33(2) PCT).

Aus dem Abschnitt "Linear and non-linear EW fluorescence excitation" und Figur 1A-C von **D2** ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen bekannt. Folglich existiert ein erster und ein zweiter evaneszenter Beleuchtungslichtstrahl.

Druckschrift **D3** zeigt in Figur 8 eine Anordnung in der Licht unterschiedlicher Lichtquellen auf die Probe zur evaneszenten Beleuchtung gelenkt wird.

4 UNABHÄNGIGER ANSPRUCH 15

- 4.1 Die vorliegende Anmeldung erfüllt weiterhin nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil auch der Gegenstand des **Anspruchs 15** im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu ist.

Anspruch 15 definiert in Form von Methodenschritten ein Verfahren zur Benutzung des Mikroskops aus **Anspruch 1**. Folglich ist der Gegenstand des

Anspruchs 15 ebenfalls nicht neu gegenüber einer der Druckschriften **D1-D3** aus den gleichen Gründen, wie bereits im Abschnitt 3, oben erläutert.

5 ABHÄNGIGE ANSPRÜCHE 2-14, 16-28

Die Ansprüche 2-14, 16-28 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, einen Gegenstand definieren, der die Erfordernisse des PCT in Bezug auf Neuheit bzw. erfinderische Tätigkeit erfüllt:

Ansprüche 2-5,16-19:

Aus Druckschrift **D3** ist aus den Figuren 1-2 bekannt, das Licht in den Randbereich der Objektivpupille zu fokussieren und den Beleuchtungswinkel durch Veränderung des Abstands zur optischen Achse zu verändern.

Ansprüche 6,7,20,21:

Siehe Bemerkungen 2.2 und 2.3, oben. Aus **D1**, Figur 3b und dem erläuternden Text ist weiterhin bekannt, dass STED-Verfahren mit evaneszenter Beleuchtung vorzunehmen. Daher scheint es auch naheliegend, das aus **D4** bekannte CARS-Verfahren zur Untersuchung von lebenden Zellen mit evanszenter Beleuchtung vorzunehmen, um grenznahe Prozesse zu untersuchen.

Ansprüche 8,9,22,23:

Die tiefenabhängige Anregung bzw. Stimulation ist aus der Beschreibung zum STED Verfahren in **D1** bekannt.

Ansprüche 10,11,24,25:

Die gepulste Anregung mit einstellbarem Pulsabstand ist aus **D1** bekannt, da dies für STED Anregung notwendig ist.

Ansprüche 12,26:

Die Einstellbarkeit von Durchmessers ist eine allgemein bekannte Standardmaßnahme.

Ansprüche 13,27:

D1 offenbart die Verwendung eines Ti:Sapphire-Lasers, der eine Breitbandlichtquelle darstellt.

Ansprüche 14,28:

Die Kombination mit einem Rastermikroskop erscheint naheliegend.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 21 DEC 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 44 410.6

Anmeldetag:

25. September 2003

Anmelder/Inhaber:

Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
68165 Mannheim/DE

Bezeichnung:

Rastermikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

IPC:

G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stanschus

Rastermikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop.

- In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahlenbündels wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.

- Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine

- Strahlableinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht
- 5 gelangt über die Strahlableinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die
- 10 Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.
- 15 Aus US 2002/0097489 A1 ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung einer Probe bekannt. Das Mikroskop beinhaltet eine Weißlichtquelle, deren Licht über eine Schlitzblende durch das Mikroskopobjektiv hindurch in den eine Probe tragenden Objektträger zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt wird. Das Beleuchtungslicht pflanzt sich in dem Objektträger
- 20 durch totalinterne Reflexion fort, wobei die Beleuchtung der Probe nur im Bereich des aus dem Objektträger herausragenden evaneszenten Feldes erfolgt. Mikroskope dieser Art sind unter dem Begriff TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescent Microscope) bekannt.
- Die z-Auflösung von TIRF-Mikroskopen ist aufgrund des nur ca. 100 nm in die
- 25 Probe ragenden evaneszenten Feldes außerordentlich gut.
- Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Rastermikroskop anzugeben, mit dem sowohl die Vorteile einer evaneszenten Beleuchtung als auch die Vorteile der Rastermikroskopie nutzbar sind.
- Die Aufgabe wird durch ein Rastermikroskop mit einer Lichtquelle, die eine auf
- 30 einem Objektträger angeordnete Probe evaneszent beleuchtet, mit einem Punktdetektor, der von einem Rasterpunkt der Probe ausgehendes

Detektionslicht empfängt, und mit einer im Strahlengang des Detektionslichtes angeordneten Strahlablenkeinrichtung zum Verschieben der Position des Rasterpunktes in der Probe, gelöst.

- Die Erfindung hat den Vorteil, dass sowohl eine Abrasterung der Probe in zwei
5 Dimensionen oder in drei Dimensionen, als auch ein stark gesteigertes Auflösungsvermögen in z-Richtung ermöglicht ist.

- Das Abrastern der Probe in lateraler Richtung (xy-Richtung) wird mit Hilfe der im Strahlengang des Detektionslichtes angeordneten Strahlablenkeinrichtung bewirkt. Zum Abrastern der Probe in axialer Richtung (z-Richtung) ist der
10 Relativabstand von Probe und Objektiv verstellbar. Hierzu kann entweder die Probe auf einen höhenverstellbaren Tisch angeordnet sein oder ein in z-Richtung verstellbares Objektiv verwendet werden.

- Das Beleuchtungslicht ist vorzugsweise durch das Objektiv des Rastermikroskops in das Deckglas der Probe einkoppelbar. In einer anderen
15 Variante wird das Beleuchtungslicht durch den Kondensor des Rastermikroskops in den Objektträger eingekoppelt. In einer ganz anderen Variante erfolgt die Einkopplung weder durch das Objektiv noch durch den Kondensor sondern direkt, beispielsweise über ein Prisma, in den Objektträger.

- 20 Das Beleuchtungslicht verläuft vorzugsweise durch den Außenrandbereich der Objektivpupille, um zu gewährleisten, dass der kritische Winkel der Totalreflexion im Deckglas erreicht wird. Vorzugsweise ist das Beleuchtungslicht zu einem Beleuchtungslichtstrahlenbündel geformt, das vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille einen Fokus aufweist. Das
25 Beleuchtungslichtstrahlenbündel kann während der Untersuchung einer Probe ortsfest bleiben. In einer besonders bevorzugten Variante ist das Beleuchtungslichtstrahlenbündel mit Hilfe einer weiteren Strahlablenkeinrichtung kreisend durch den Außenbereich der Objektivpupille beweglich. Hierdurch wird in besonders vorteilhafter Weise eine sehr
30 homogene und gleichmäßige Beleuchtung erreicht.

Das Objektiv weist vorzugsweise eine numerische Apertur auf, die größer als 1,3 ist und besonders vorteilhafterweise zwischen 1,35 und 1,42 liegt.

5 In einer bevorzugten Ausgestaltungsform ist im Strahlengang des Beleuchtungslichtes vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille eine farbselektive Segmentblende angeordnet. Die farbselektive Segmentblende weist im Außenrandbereich andere optische Eigenschaften auf, als im Innenbereich. Vorzugsweise ist die farbselektive Segmentblende im Außenrandbereich für Licht der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent, während sie im Innenbereich ausschließlich für Licht oberhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist. Diese Ausgestaltungsvariante ist insbesondere für Fluoreszenzanwendungen, bei denen die Wellenlänge des Detektionslichts naturgemäß oberhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts liegt, besonders zu bevorzugen.

15 In einer anderen Variante ist die farbselektive Segmentblende im Innenbereich ausschließlich für Licht unterhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent. Diese Variante ist insbesondere zur Mehrphotonenanregung der Probe geeignet. Hierbei ist das Beleuchtungslicht vorzugsweise gepulstes Infrarotlicht.

20 Mit Hilfe der farbselektiven Segmentblende wird vermieden, dass Beleuchtungslicht außerhalb des Außenrandbereiches durch das Objektiv auf die Probe gelangt und die Probe direkt beleuchtet.

25 In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante weist das Beleuchtungslicht mehrere Wellenlängen auf. In dieser Variante sind beispielsweise mehrere unterschiedliche Probenfarbstoffe gleichzeitig optisch anregbar.

30 Der Punktdetektor beinhaltet vorzugsweise in einer zur Fokalebene des Objektivs korrespondierenden Ebene eine Detektionslochblende. Die räumliche Lage des Rasterpunktes, von dem der Punktdetektor Detektionslicht empfangen kann, ist durch die Position der Detektionslochblende und durch die Stellung der Strahlableitvorrichtung festgelegt.

In einer bevorzugten Variante beinhaltet der Punktdetektor einen Multibanddetektor oder ein Spektrometer. Hierdurch ist es ermöglicht, spektrale Punktinformationen aus der Probe zu erhalten. Insbesondere in Kombination mit einer Mehrfarbbeleuchtung ist diese Ausführungsvariante von besonderem Vorteil.

Das erfindungsgemäße Rastermikroskop kann zusätzlich als konfokales Rastermikroskop ausgebildet sein, wobei gleichzeitig sowohl eine konfokale Untersuchung der Probe durch den Innenbereich der farbselektiven Segmentblende erfolgen kann, während gleichzeitig eine TIRF-Beleuchtung durch den Außenbereich der farbselektiven Segmentblende ermöglicht ist.

Zur Erzeugung des Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels in der Ebene der Objektivpupille ist im Strahlengang des Beleuchtungslichts eine Abbildungsoptik, vorzugsweise eine Bertrandlinse vorgesehen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsform umfasst der Lichtweg des Detektionslichts mehrere Detektionskanäle, wobei in jedem der Detektionskanäle ein Bandpassfilter vorgesehen sein kann.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop,

Fig. 2 eine farbselektive Segmentblende,

Fig. 3 ein weiteres erfindungsgemäßes Rastermikroskop und

Fig. 4 ein weiteres erfindungsgemäßes Rastermikroskop.

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Rastermikroskop mit einer Lichtquelle 1, die als Argonionenlaser 3 ausgebildet ist. Die Lichtquelle 1 erzeugt ein Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5, das von einem Strahlteiler 7 zu dem Objektiv 9 reflektiert wird. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 verläuft durch den Außenrandbereich der Objektivpupille 11 (durch den Doppelpfeil 24 angedeutet) und wird in das Deckglas 13 der Probe 15 zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt. Im Strahlengang des

Hf

Beleuchtungslichtstrahlenbündels 5 befindet sich eine als Bertrandlinse 17 ausgebildete Abbildungsoptik 19, die in der Ebene der Objektivpupille 11 einen Fokus erzeugt. Außerdem befindet sich im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels 5 eine weitere Strahlableskeinrichtung 21, die einen nicht gezeigten kardanisch aufgehängten Scanspiegel beinhaltet. Mit Hilfe der weiteren Strahlableskeinrichtung wird der Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels kontinuierlich kreisend durch den Außenrandbereich der Objektivpupille 11 bewegt, wodurch eine besonders homogene evaneszente Beleuchtung erreicht wird. In der Ebene der Objektivpupille 11 ist die in Fig. 2 gezeigte farbselektive Segmentblende 23 angeordnet. Die farbselektive Segmentblende 23 weist einen Außenrandbereich 25 auf, der für das Beleuchtungslicht transparent ist. Außerdem weist die farbselektive Segmentblende 23 einen Innenbereich 27 auf, der für Licht oberhalb der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist. Das von der Probe ausgehende Detektionslicht 51 gelangt durch das Objektiv und den Innenbereich der farbselektiven Segmentblende zum Strahlteiler 7, passiert diesen und gelangt über die Strahlableskeinrichtung 29, die einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 31 beinhaltet, zum Punktdetektor 33. Der Punktdetektor 33 beinhaltet eine Detektionslochblende 35, deren räumliche Lage zusammen mit der Stellung des kardanisch aufgehängten Scanspiegels 31 die Position des Rasterpunktes in der Probe bestimmt, von dem der Punktdetektor 33 Detektionslicht 51 empfängt. Der Punktdetektor 33 beinhaltet einen Multibanddetektor 36, der simultan Detektionslicht 51 in mehreren einstellbaren Wellenlängenbändern empfangen kann. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel des Argonionenlasers 3 beinhaltet Beleuchtungslicht mehrerer Wellenlängen, wodurch eine Mehrfarbanregung der Probe ermöglicht ist.

Fig. 3 zeigt ein weiteres erfindungsgemäßes Rastermikroskop, bei dem simultan zur TIRF-Untersuchung einer Probe eine konfokale Untersuchung einer Probe ermöglicht ist. Dieses Rastermikroskop beinhaltet eine weitere Lichtquelle 37, die als gepulster Titan-Saphirlaser 39 ausgebildet ist und die ein weiteres Beleuchtungslichtstrahlenbündel 41 emittiert. Das weitere

Beleuchtungslichtstrahlenbündel 41 gelangt durch einen zweiten Strahlteiler 43 und über die Strahlableitvorrichtung 29, sowie durch den Strahlteiler 7 und einen dritten Strahlteiler 45 zum Objektiv 9 und beleuchtet durch den Innenbereich 27 der Segmentblende 23 durch die Probe 15 direkt. In der Probe 15 wird unabhängig von der TIRF-Beleuchtung mit dem Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 durch das weitere Beleuchtungslichtstrahlenbündel 41 eine Zweiphotonenanregung der Probe bewirkt. Das durch die Zweiphotonenanregung der Probe entstehende weitere Detektionslicht 53 wird mit Hilfe eines Non-Descan-Detektors 47, der als CCD-Element 49 ausgebildet ist, detektiert. Dieses weitere Detektionslicht 53 gelangt über den Innenbereich des Objektivs, durch Reflektion am dritten Strahlteiler 45 zu dem Non-Descan-Detektor 47. Bei diesem Rastermikroskop ist in der Objektivpupille eine andere farbselektive Segmentblende eingesetzt, die im Außenrandbereich für das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 der Lichtquelle 1 transparent ist und die im Innenbereich für dieses Licht reflektierend ausgebildet ist. Hierdurch ist gewährleistet, dass kein Beleuchtungslicht direkt auf die Probe eingestrahlt wird. Die Strahlteiler 7, 45 und 43 sind derart ausgebildet, dass weder das Licht des Beleuchtungslichtstrahlenbündels 5 als auch des Titan-Saphirlasers 39 zu dem Punktdetektor 33 oder zu dem Non-Descan-Detektor 47 gelangt.

In Fig. 4 ist eine weitere denkbare Variante des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dargestellt. In diesem Fall besteht die Lichtquelle 1 aus einem Titan-Saphirlaser 55, der ein Beleuchtungslichtstrahlenbündel 5 emittiert, das als TIRF-Beleuchtung durch den Außenrandbereich 25 einer farbselektiven Segmentblende 23 geführt wird. Die evaneszente Beleuchtung induziert in der Probe 15 Mehrphotonenanregung. Das daraus entstehende Fluoreszenzlicht gelangt durch die gesamte Segmentblende 23 über den dritten Strahlteiler 45 zum Non-Descan-Detektor 47, der als CCD-Element 49 ausgeführt ist. Direkt im Anschluss daran wird ein dreidimensionales Bild der Probe durch konfokale Beleuchtung mit einer Lichtquelle 37, die aus einem Argonionenlaser 57 besteht, und Detektion mit einem Punktdetektor 33, der als Multibanddetektor 36 ausgebildet ist, aufgenommen.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	Lichtquelle
	3	Argonionenlaser
5	5	Beleuchtungslichtstrahlenbündel
	7	Strahlteiler
	9	Objektiv
	11	Objektivpupille
	13	Deckglas
10	15	Probe
	17	Bertrandlinse
	19	Abbildungsoptik
	21	Strahlableinrichtung
	23	Segmentblende
15	24	Doppelpfeil
	25	Außenrandbereich
	27	Innenbereich
	29	Strahlableinrichtung
	31	Scanspiegel
20	33	Punkt-detektor
	35	Detektionslochblende
	36	Multibanddetektor
	37	Lichtquelle
	39	Titan-Saphirlaser
25	41	Beleuchtungslichtstrahlenbündel
	43	zweiter Strahlteiler
	45	dritter Strahlteiler
	47	Non-Descan-Detektor
	49	CCD-Element
30	51	Detektionslicht
	53	Detektionslicht
	55	Titan-Saphir-Laser
	57	Argonionenlaser

Hf

Patentansprüche

1. Rastermikroskop mit einer Lichtquelle, die eine auf einem Objektträger angeordnete Probe evaneszent beleuchtet, mit einem Punktdetektor, der von einem Rasterpunkt der Probe ausgehendes Detektionslicht empfängt, und mit einer im Strahlengang des Detektionslichtes angeordneten Strahlablenkeinrichtung zum Verschieben der Position des Rasterpunktes in der Probe.
2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht in den Objektträger oder in das Deckglas der Probe einkoppelbar ist.
3. Rastermikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop einen Kondensor aufweist und das Beleuchtungslicht durch den Kondensor in den Objektträger einkoppelbar ist.
4. Rastermikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop ein Objektiv aufweist und das Beleuchtungslicht durch das Objektiv in das Deckglas einkoppelbar ist.
5. Rastermikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Objektiv eine Objektivpupille aufweist und dass das Beleuchtungslicht durch den Außen-Randbereich der Objektivpupille verläuft.
6. Rastermikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht in einem Beleuchtungslichtstrahlenbündel verläuft.
7. Rastermikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungslichtstrahlenbündel in der Ebene der Objektivpupille einen Fokus aufweist.
8. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang des Beleuchtungslichtes eine weitere Strahlablenkeinrichtung vorgesehen ist, mit der die räumliche Lage des Beleuchtungslichtstrahlenbündels veränderbar ist.
9. Rastermikroskop nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Strahlablenkeinrichtung das Beleuchtungslichtstrahlenbündel

kreisend durch den Außen-Randbereich der Objektivpupille lenkt.

10. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Objektiv eine numerische Apertur größer 1,3, vorzugsweise zwischen 1,35 und 1,42, aufweist.
- 5 11. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang des Beleuchtungslichtes, vorzugsweise in der Ebene der Objektivpupille, eine farbselektive Segmentblende angeordnet ist.
- 10 12. Rastermikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die farbselektive Segmentblende im Außen-Randbereich für Licht der Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist.
13. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die farbselektive Segmentblende im Innenbereich ausschließlich für Licht oberhalb Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist.
- 15 14. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die farbselektive Segmentblende im Innenbereich ausschließlich für Licht unterhalb Wellenlänge des Beleuchtungslichts transparent ist.
15. Rastermikroskop nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht, vorzugsweise gepulstes Infrarotlicht ist.
- 20 16. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht mehrere Wellenlängen aufweist.
17. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Punktdetektor einen Multibanddetektor oder ein Spektrometer beinhaltet.
- 25 18. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Punktdetektor eine Detektionslochblende beinhaltet.
19. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Rastermikroskop als konfokales Rastermikroskop ausgebildet ist.

30

Hf

Zusammenfassung

Ein Rastermikroskop beinhaltet eine Lichtquelle, die eine auf einem Objektträger angeordnete Probe evaneszent beleuchtet. Ein Punktdetektor empfängt von einem Rasterpunkt der Probe ausgehendes Detektionslicht, wobei im Strahlengang des Detektionslichtes eine Strahlableitenrichtung angeordnet ist mit der die Position des Rasterpunktes in der Probe verschiebbar ist.

10 Fig. 1

Hf

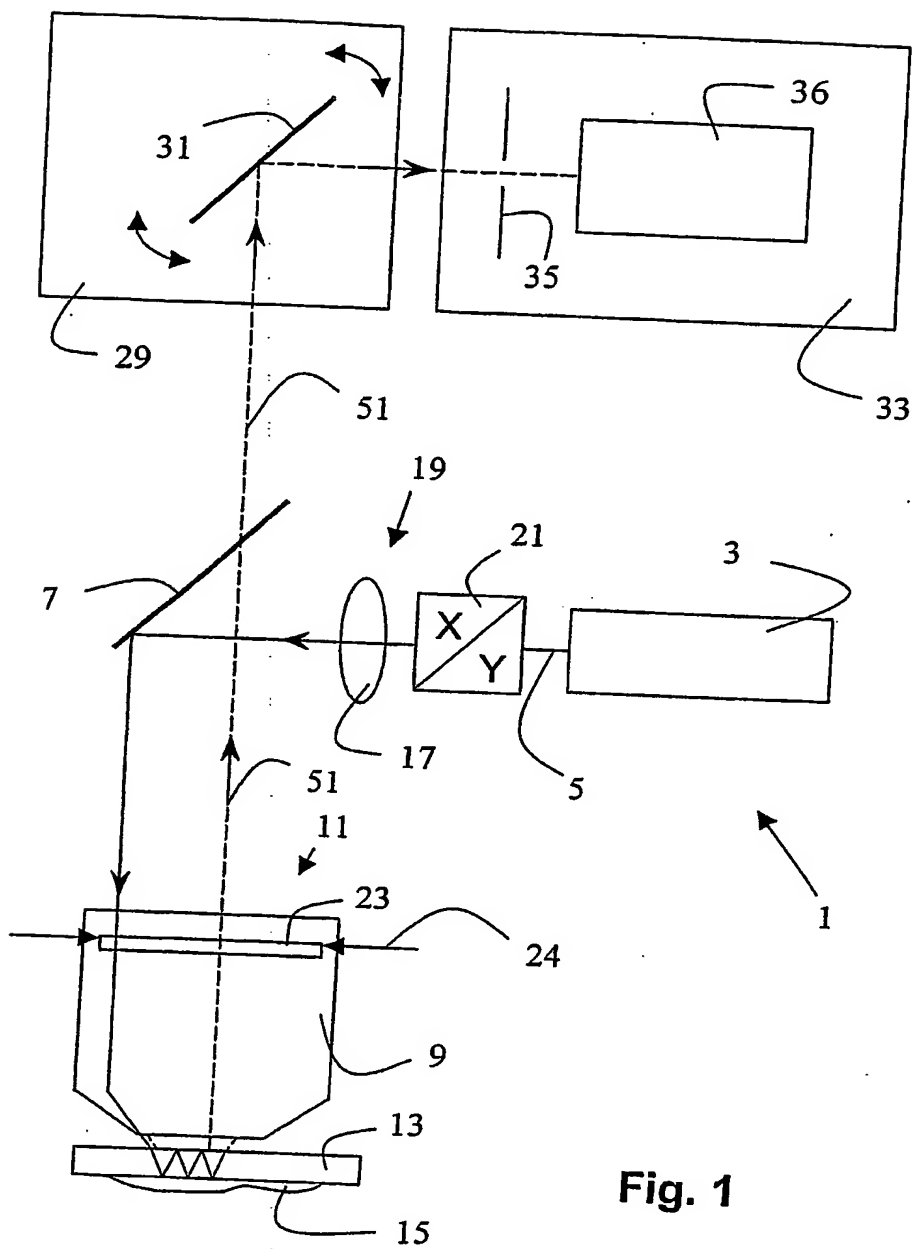


Fig. 1

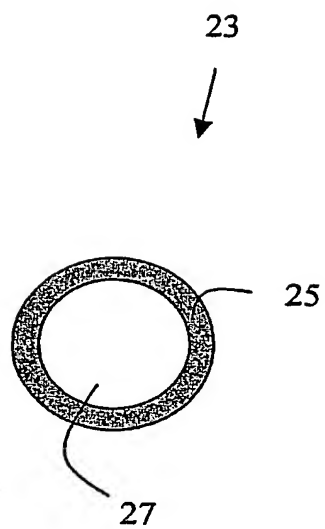


Fig. 2

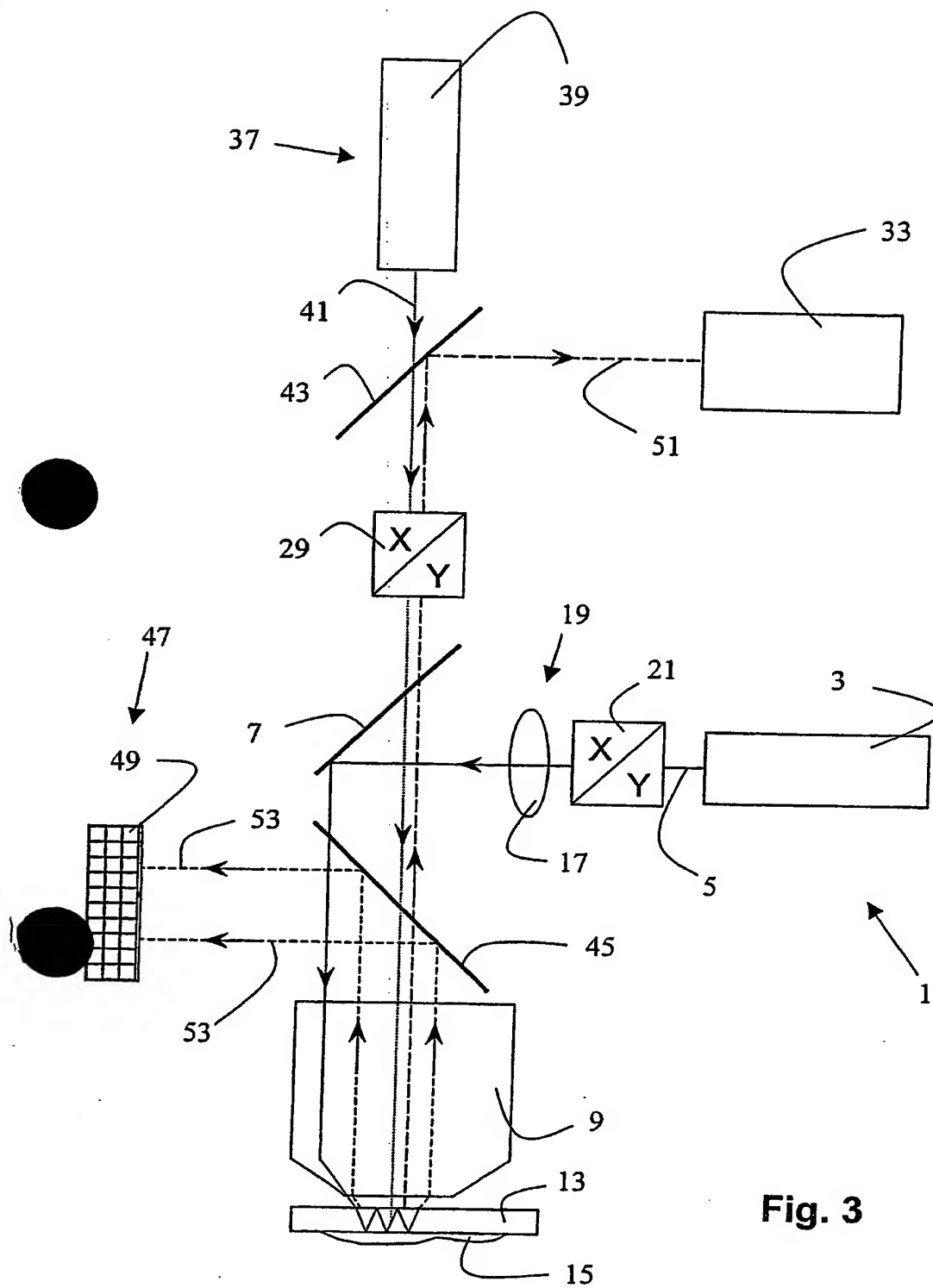


Fig. 3

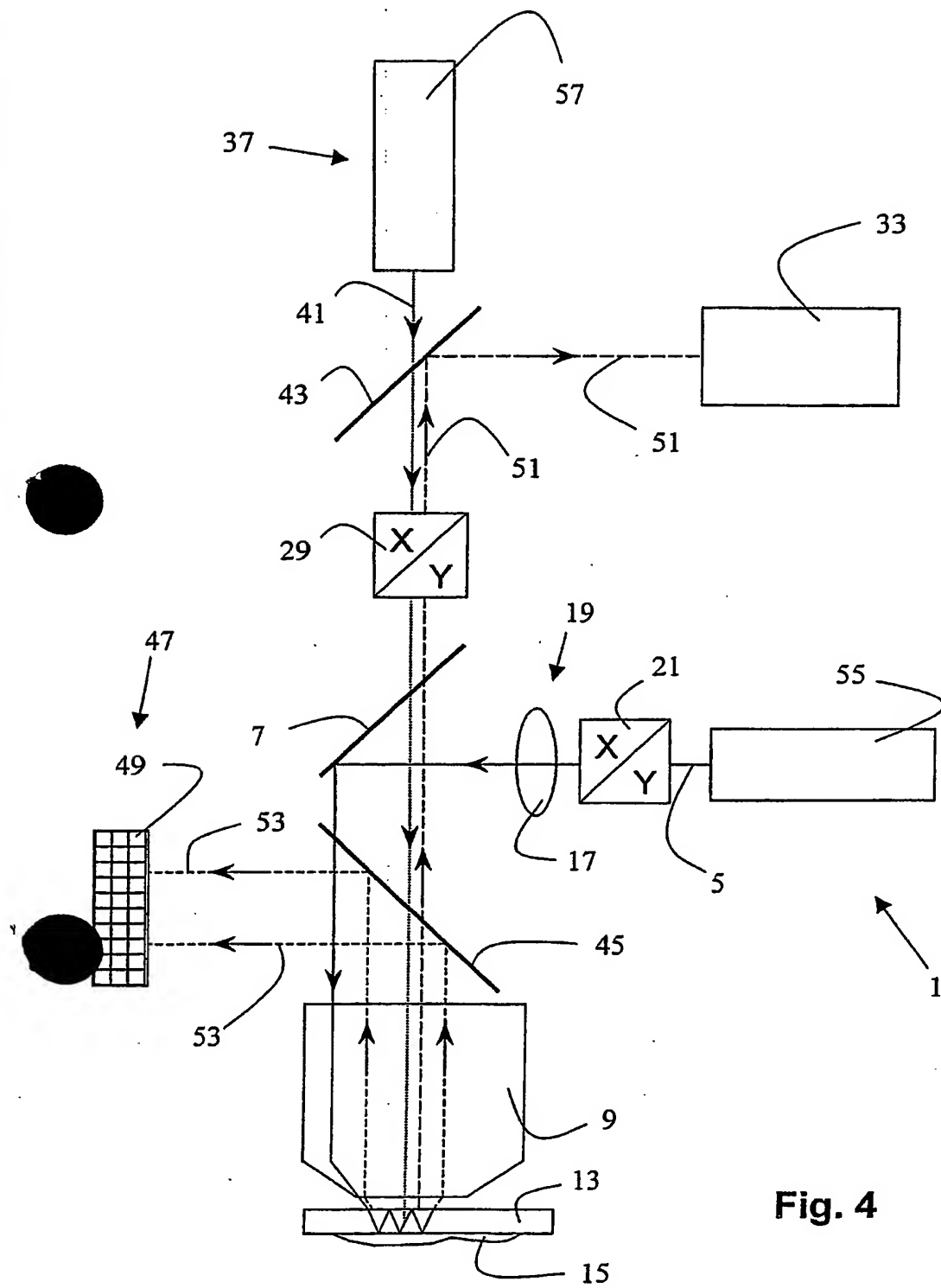
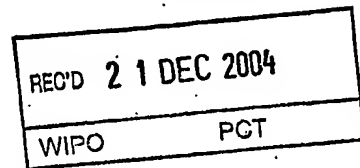


Fig. 4

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17:1(a) OR (b)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 044 310.6
Anmeldetag: 10. September 2004
Anmelder/Inhaber: LEICA Microsystems Heidelberg
GmbH, 68165 Mannheim/DE
Bezeichnung: Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung
IPC: G 02 B 21/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brosig

Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe.

- 5 Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe.

- 10 Aus US 2002/0097489 A1 ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung einer Probe bekannt. Das Mikroskop beinhaltet eine Weißlichtquelle, deren Licht über eine Schlitzblende durch das Mikroskopobjektiv hindurch in den eine Probe tragenden Objektträger zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt wird. Das Beleuchtungslicht pflanzt sich in dem Objektträger durch totalinterne Reflektion fort, wobei die Beleuchtung der Probe nur im Bereich des aus dem Objektträger herausragenden evaneszenten Feldes erfolgt. Mikroskope dieser Art sind unter dem Begriff TIRFM (Total Internal
- 15 Reflection Fluorescent Microscope) bekannt.

Die z-Auflösung von TIRF-Mikroskopen ist aufgrund des nur ca. 100 nm in die Probe ragenden evaneszenten Feldes außerordentlich gut.

Aus DE 101 08 796 A1 ist ein hochaperturiges Objektiv, insbesondere für TIRF-Anwendungen bekannt. Das Objektiv besteht aus einer ersten Linse mit

5 einer positiven Brechkraft, einer zweiten Linse mit negativer Brechkraft, wobei das Brennweitenverhältnis zwischen den beiden Linsen im Bereich von - 0,4 und - 0,1 liegt und die Gesamtbrechkraft größer Null ist. Ferner beinhaltet das Objektiv zwei positive Linsen, deren Verhältnisdurchmesser zur Brennweite größer 0,3 und kleiner 0,6 ist. Ferner beinhaltet das Objektiv eine Negativlinse und einer Sammellinse, wobei die Negativlinse der Frontgruppe zugewandt ist und das Brennweitenverhältnis der Negativlinse und der Sammellinse zwischen - 0,5 und - 2 liegt.

10 Aus DE 102 17 098 A1 ist eine Auflichtbeleuchtungsanordnung für die TIRF-Mikroskopie bekannt. Die Auflichtbeleuchtungsanordnung beinhaltet eine Beleuchtungsquelle, die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlenbündel abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse propagiert und eine Umlenkeinrichtung, die das Beleuchtungsstrahlenbündel umlenkt und parallel zur optischen Achse in das
15 Objektiv einkoppelt. Es ist bei dieser Auflichtbeleuchtungsanordnung vorgesehen, dass das von der Beleuchtungsquelle abgegebene Beleuchtungsstrahlenbündel s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer Phasendifferenz aufweist und die Umlenkeinrichtung das Beleuchtungsstrahlenbündel x-mal reflektiert, wobei $x = (n \times 180^\circ - d)/60^\circ$.

20 Aus DE 101 43 481 A1 ist ein Mikroskop zur TIRM (Total Internal Reflection Microscopy) bekannt. Das Mikroskop weist ein Mikroskopgehäuse und ein Objektiv auf. Das von einer Beleuchtungseinrichtung ausgehende Beleuchtungslicht kann über einen in das Mikroskopgehäuse einschiebbaren Adapter eingekoppelt werden.

25 Aus US 2004/0001253 A1 ist ein Mikroskop mit einem optischen Beleuchtungssystem, das ein einfaches Umschalten zwischen evaneszenter Beleuchtung und Reflektionsbeleuchtung ermöglicht. Das Beleuchtungssystem beinhaltet eine Laserlichtquelle, deren Licht in eine optische Faser eingekoppelt wird. Ferner ist eine Auskoppeloptik vorgesehen,
30 die das aus der Faser austretende Licht in einen hinteren Brennpunkt des Mikroskopobjektivs fokussiert. Die optische Faser ist in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs verschiebbar.

5 Aus DE 102 29 935 A1 ist eine Einrichtung zur Einkopplung von Licht in einem Mikroskop bekannt. Dabei wird in der Leuchtfeldblendenebene durch eine als Schieber ausgeführte Lichtleitfaser-Einkopplung Laserlicht auf das Präparat gerichtet. Die Erfindung ist insbesondere für das TIRF-Verfahren geeignet.

10 In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahlenbündels wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt
15 kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.

20 Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw.
25 Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird
30 Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch

sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

- 5 Anordnungen, die das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Anregungslichtstrahls gegeben. Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/DE/95/00124 bekannt. Hierbei
- 10 werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert
- 15 wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

- Beispielsweise aus US 2002/0167724 A1 und aus US 6,667,830 B1 ist eine
- 20 Variante der STED-Technik bekannt, bei der die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche mit dem Licht des zweiten Lasers zunächst weiter – nämlich in einen dritten Zustand – angeregt werden. Bei dieser Variante, für die sich auch der Begriff „up-conversion“ eingebürgert hat, wird äquivalent zu der Variante der direkten stimulierten Abregung in den Grundzustand eine
- 25 Auflösungssteigerung erzielt.

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)-Mikroskopie ist eine Technik, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein großer Vorteil ist, dass die Proben nicht mit Farbstoffen markiert werden müssen. Außerdem können lebende Zellen untersucht werden.

- 30 Im Vergleich zur herkömmlichen Raman-Mikroskopie und der bekannten konfokalen Raman-Mikroskopie kann man bei der CARS-Mikroskopie eine

höhere Ausbeute an Detektionslicht erzielen, störende Nebeneffekte besser unterdrücken und das Detektionslicht leichter vom Beleuchtungslicht trennen. Für die konventionelle konfokale Raman-Spektroskopie wird ein Detektionspinhole benötigt, um eine gute axiale Auflösung zu erreichen, sowie
5 ein hochauflösendes Spektrometer. CARS dagegen ist ein nichtlinearer optischer Prozess (Vierwellen-Mischprozess). Ähnlich, wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie, bei der zwei oder mehr Photonen gleichzeitig absorbiert werden, wird, da die Wahrscheinlichkeit des Phasenrichtigen gleichzeitigen Zusammentreffens mehrerer Photonen im Fokus auf Grund der
10 höheren Photonendichte am größten ist, kein Detektionspinhole benötigt. Ohne Detektionspinhole wird die gleiche axiale Auflösung erzielt wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie. Für die CARS-Spektroskopie werden üblicherweise 2 Laser, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren (ν_P und ν_S , Pump- und Stokeslaser), benutzt, wobei ν_S durchstimmbar sein sollte,
15 um ein CARS-Spektrum ν_{CARS} zu erzeugen ($\nu_{CARS} = 2\nu_P - \nu_S$, $I_{CARS} \sim (I_P)^2 \cdot I_S$). Stimmt die Differenzfrequenz $\nu_P - \nu_S$ mit der Differenzfrequenz zwischen zwei molekularen Vibrationszuständen $|1\rangle$ und $|0\rangle$ in der Probe überein, so ist das CARS-Signal sogar noch verstärkt. Der Pumplichtstrahl und der Stokeslichtstrahl werden bei mikroskopischen Anwendungen koaxial
20 vereinigt und gemeinsam auf dasselbe Probenvolumen fokussiert. Die Richtung, in der die Anti-Stokes-Strahlung emittiert wird, ergibt sich aus der Phasenanpassungsbedingung für den Vier-Wellen-Mischprozess.

Aus der US-Patentschrift 4,405,237 „Coherent anti-Stokes Raman device“ ist eine Vorrichtung bekannt, bei der zwei gepulste Laserstrahlen, die von zwei
25 Lasern erzeugt werden und die unterschiedliche Wellenlängen im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich des Spektrums aufweisen, genutzt werden, um eine Probe simultan zu beleuchten. Bei geeigneter Wahl der Wellenlängen kann die Probe derart angeregt werden, dass sie die charakteristische Coherent anti-Stokes Raman-Strahlung emittiert.

30 Aus James W.M. Chon, Min Gu, „Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: Image

formation", Appl. Opt. 43, 1063-1071, 2004 und aus Florian Schapper, José T. Gonçalves, Martin Oheim, "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation", Eur. Biophys. J. 32, 635-643, 2003 ist bekannt eine evaneszent beleuchtete Probe über einen
5 Zweiphotonenprozess anzuregen.

Die bislang bekannten Techniken zur evaneszenten Probenbeleuchtung erlauben lediglich die Probenschichten zu untersuchen, die direkt an das Deckglas bzw. direkt an den Objektträger angrenzen.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Mikroskop anzugeben, das
10 eine weitgehend flexible Probenuntersuchung, insbesondere auch der Bereiche, die nicht unmittelbar an das Deckglas oder an den Objektträger angrenzen, zu ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch ein Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe
15 evaneszent beleuchtet.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur - insbesondere rastermikroskopischen - Untersuchung einer Probe anzugeben, die weitgehend flexibel ist und sich nicht auf die Probenschichten beschränkt, die unmittelbar an das Deckglas bzw. an den Objektträger angrenzen.

Die weitere Aufgabe wird durch ein Verfahren zur - insbesondere mikroskopischen - Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten gelöst:

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
- Beleuchten der Probe mit dem ersten und dem zweiten Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste
25 Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante weist das Mikroskop ein Objektiv mit einer Objektivpupille auf, wobei der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel im Bereich der Objektivpupille einen Fokus
30 aufweist. Vorzugsweise ist ein Einstellmittel vorgesehen, mit dem die

5 räumliche Position des Fokus innerhalb der Ebene der Objektivpupille
veränderbar ist. Das Einstellmittel kann beispielsweise eine
Strahlableitvorrichtung mit mehreren Dreh- oder Kippspiegeln oder mit einem
kardanisch aufgehängten Spiegel umfassen. Das Einstellmittel kann auch als
akustooptisches Element ausgebildet sein oder Mikrospiegel beinhalten. Zum
Einstellen der räumlichen Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten
Beleuchtungslichtstrahlenbündels kann auch eine verschiebbare Lichtleitfaser
dienen.

10 Der Winkel bezüglich der optischen Achse des Objektivs, unter dem der zur
evaneszenten Beleuchtung der Probe vorgesehene
Beleuchtungslichtstrahlenbündel das Objektiv verlässt, hängt von der
räumlichen Position des Fokus in der Objektivpupille ab. Der Winkel ist umso
größer, je größer der Abstand des jeweiligen Fokus von der optischen Achse
ist. Daher ist erfindungsgemäß insbesondere der Abstand des Fokus von der
15 optischen Achse des Objektivs zur Einstellung des Winkels und damit zur
Einstellung der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe
einstellbar.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen
Rastermikroskops ist um eine CARS-Untersuchung einer Probe zu realisieren.
20 Der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Pumplichtstrahl und der zweite
Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Stokeslichtstrahl.

In einer anderen, ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsform des
erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist insbesondere zur Erzielung einer
hohen Ortsauflösung das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein
25 Anregungslichtstrahlenbündel zur optischen Anregung eines ersten
Probenbereichs und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein
Stimulationslichtstrahlenbündel zum Auslösen einer stimulierten Emission
oder zum Auslösen einer weiteren Anregung, wobei die stimulierte Emission
und/oder die weitere Anregung in einem weiteren zumindest teilweise mit dem
30 ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich stattfindet.

Besonders bevorzugt ist eine Variante, bei der das

Anregungslichtstrahlenbündel und das Stimulationslichtstrahlenbündel beide die Probe evaneszent beleuchten, wobei das Anregungslichtstrahlenbündel eine größere Eindringtiefe aufweist als das Stimulationslichtstrahlenbündel. Um dies zu realisieren, wird der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahlenbündels in der Objektvupille von der optischen Achse des Objektivs größer gewählt, als der Abstand des Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels in der Objektvupille von der optischen Achse. Durch den relativ tiefer eindringenden Anregungslichtstrahlenbündel wird die Probe in einer an das Deckglas bzw. an den Objektträger angrenzenden relativ breiten Schicht optisch angeregt und durch den Stimulationslichtstrahl in einer relativ schmalen, an den Objektträger bzw. an das Deckglas angrenzenden –mit der ersten Schicht überlappenden- Schicht stimuliert, optisch abgeregt, so dass letztlich weitgehend ausschließlich Fluoreszenzphotonen aus dem Teil der mit dem Anregungslichtstrahlenbündel beleuchteten Schicht detektiert werden, die nicht von dem Stimulationslichtstrahlenbündel beleuchteten Schicht räumlich überlagert ist.

In einer anderen erfindungsgemäßen Variante wird die Probe von dem Anregungslichtstrahlenbündel evaneszent beleuchtet und von dem direkt beleuchteten Stimulationslichtstrahlenbündel optisch stimuliert abgeregt. Das Stimulationslichtstrahlenbündel ist hierbei vorzugsweise derart manipuliert, dass der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels innen hohl ausgebildet ist. Ein Hohlfokus ist beispielsweise mit Hilfe von Phasenfiltern, die in einer zur Fokalebene des Objektivs konjugierten Ebene (Fourierebene) angeordnet sind. Als Phasenfilter kann beispielsweise eine $\lambda/2$ -Platte fungieren, die von dem Stimulationslichtstrahl überleuchtet wird, so dass nur der innere Teilbereich des Stimulationslichtstrahlenbündels durch die $\lambda/2$ -Platte verläuft, während der äußere Ring an der $\lambda/2$ -Platte vorbei verläuft. Letztlich werden die Fluoreszenzphotonen detektiert, die aus dem vom Anregungslichtstrahlenbündel evaneszent beleuchteten Teilbereich der Probe stammen, der im inneren des Hohlfokus des Stimulationslichtstrahlenbündels liegt. Auf diese Weise kann eine Abrasterung der Probe mit einer sehr hohen Ortsauflösung erfolgen. In z-Richtung ist die Ortsauflösung durch die

Eindringtiefe des evaneszent beleuchteten Anregungslichtstrahls gegeben (z.B. 100 nm), während in den axialen Richtungen das Auflösungsvermögen durch die Abmessungen des Hohlfokus bestimmt sind. Zum Abrastern der Probe wird der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels vorzugsweise mit
5 einer Strahlableitvorrichtung, vorzugsweise mäanderförmig über bzw. durch die Probe geführt.

In einer besonderen Ausgestaltungsvariante erfolgt durch das Stimulationslichtstrahlenbündel eine weitere Anregung der bereits angeregten Probenbereiche in einem dritten Anregungszustand. Auch diese Variante ist
10 geeignet, um eine hohe Ortsauflösung zu erzielen.

Vorzugsweise ist das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst. Hierzu kann beispielsweise zumindest eine gepulste Lichtquelle, wie ein modemverkuppelter Puls laser (z.B. Titansaphirlaser) vorgesehen sein. Auch
15 die Verwendung von gepulsten Halbleiterlasern oder von regenerativen Verstärkern ist beispielsweise möglich.

Von besonderem Vorteil ist eine Ausgestaltungsform, bei der das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst sind, wobei der zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. In dieser Variante können beispielsweise zwei Lichtquellen aufeinander synchronisiert sein, wobei der zeitliche Abstand der Pulse durch einstellbare Verzögerungsstrecken einstellbar ist. In einer anderen Variante kann auch das
20 Licht des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und das Licht des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels von einer einzigen Lichtquelle entstammen, die einen aufzuteilenden Primärlichtstrahl emittiert, wobei vorgesehen sein kann, dass in den aufgeteilten Lichtzweigen eine Wellenlängenveränderung (OPO; mikrostrukturierte Faser; Frequenzvervielfachung) oder eine
25 Leistungsveränderung (z.B. Verstärker oder Abschwächer) erfolgt.

Das erfindungsgemäße Mikroskop weist vorzugsweise zumindest eine

- Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle auf. Vorzugsweise sind die Wellenlängen bzw. ist die Wellenlänge des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar. Es ist erfindungsgemäß
- 5 möglich, dass der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und auch der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel Licht einer oder mehrerer Wellenlängen beinhalten kann, wobei sich die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels voneinander unterscheiden können.
- 10 In einer besonders bevorzugten Variante ist der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Öffnungswinkel des zu einem in der Objektvupille liegenden Fokus zusammenlaufenden Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. Durch
- 15 Änderung des Öffnungswinkels bei der Fokussierung in die Objektvupille ändert sich die Größe der Fläche, die evaneszent beleuchtet wird. Wählt man die Fläche der durch den Stimulationslichtstrahl evaneszent beleuchteten Fläche so, dass sie kleiner ist als die von dem evaneszent anregenden Beleuchtungslichtstrahlenbündel beleuchtete Fläche, so kann man einen
- 20 direkten Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in unmittelbarer Nähe der Objektträgeroberfläche zu den Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in tiefergelegenen Schichten erhalten.
- Bei einer vorteilhaften Variante wird die Probe mit einer evaneszenten
- 25 Anregungs-Beleuchtung mit einer relativ hohen Eindringtiefe beleuchtet werden. Mit einer evaneszenten STED-Beleuchtung (Stimulationslichtstrahlenbündel), die eine geringe Eindringtiefe aufweist (größerer Eintrittswinkel in den Objektträger), wird eine Fluoreszenz direkt am Objektträger stimuliert abgeregt. Die Aufnahme des Fluoreszenzbildes erfolgt
- 30 zeitlich später (time-gated CCD), so dass nur Fluoreszenzphotonen aus tiefer liegenden Probenschichten detektiert werden. Die Einstellung der jeweiligen Tiefen sind sogar einstellbar, indem die radialen Positionen der beiden

Beleuchtungslichtfokusse in der Objektivpupille variiert werden. Die Beleuchtungslichtintensität in der Probe nimmt bei TIRF exponentiell mit der Eindringtiefe ab. Umso effektiver ist der STED-Effekt direkt an der Objektträgeroberfläche, so dass z.B. Probenschichten ab 100nm Tiefe
5 vermessen werden können.

Vorzugsweise sind vor dem Detektor (beispielsweise Multibanddetektor), der beispielsweise als Kamera ausgestaltet sein kann, Bandpassfilter und/oder Kantenfilter angeordnet auf die jeweilige Emissionsbandbreite des Fluoreszenzsignals durch abgestimmt sind. Zur Farbselektion kann ein
10 dispersives Element vorgesehen sein, dass eine spektrale Aufspaltung erzeugt, aus der die zu detektierenden Wellenlängenanteile ausgeblendet werden. Der Detektor kann auch als Farbdetektor, beispielsweise als Farbkamera ausgestaltet sein. Genauso ist es möglich, dass ein dispersives Element das Detektionslicht auf mehrere Detektoren aufteilt, um eine
15 Spektraldetektion zu erreichen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Mikroskop ein Rastermikroskop; insbesondere ein konfokales Rastermikroskop:

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und
20 wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 Ein erfindungsgemäßes Mikroskop und

Fig. 2 Eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur
Erläuterung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.

25

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Mikroskop mit einer ersten Lichtquelle 1, die ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 erzeugt. Das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel gelangt zu einer ersten Strahlableitvorrichtung 5, die einen kardanisch aufgehängten Drehspiegel 7
30 beinhaltet und wird von dieser Strahlableitvorrichtung zu einer ersten Optik 9,

einer zweiten Optik 11 und einer dritten Optik 13 geführt und von einem Strahlteiler 15, der als dichroitischer Strahlteiler 17 ausgeführt ist, zu dem Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das Mikroskopobjektiv 19 weist eine hintere Brennebene (Objektivpupillenebene 21) auf. Das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 weist in der Objektivpupillenebene 21 einen als Punkt dargestellten Fokus 23 auf. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 wird zur evaneszenten Beleuchtung der Probe 25 in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Zwischen dem Objektträger und dem Objektiv 19 befindet sich ein Immersionsmittel 29. Das Mikroskop weist eine zweite Lichtquelle 31, die ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 emittiert auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 gelangt über eine zweite Strahlableitvorrichtung 35, die einen zweiten kardanischn aufgehängten Drehspegel 37 beinhaltet, zur ersten Optik 9, zur zweiten Optik 11 und zur dritten Optik 13 und wird von dem Strahlteiler 15 zum Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 weist in der Objektivpupillenebene einen Fokus 39 auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 wird ebenfalls zur evaneszenten Probenbeleuchtung in den Objektträger 27 eingekoppelt. Das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel verlässt das Mikroskopobjektiv 19 unter einem Winkel α zur optischen Achse 41 des Objektivs 19, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 das Objektiv 19 unter einem Winkel β verlässt. Der Winkel α ist durch Verändern des Abstandes des ersten Fokus 23, des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 zur optischen Achse 41 des Objektivs 19 einstellbar. Analog ist der Winkel β durch Verändern des Abstandes des zweiten Fokus 39 von der optischen Achse 41 einstellbar. Die Einstellung der Position des ersten Fokus 23 und des zweiten Fokus 39 erfolgt mit Hilfe der ersten Strahlableitvorrichtung 5 bzw. mit Hilfe der zweiten Strahlableitvorrichtung 35, die vorzugsweise jeweils in einer zur Objektivpupillenebene 21 korrespondierenden Ebene angeordnet sind. Da die Eindringtiefe der evaneszenten Beleuchtung direkt vom Winkel α bzw. vom Winkel β abhängt, kann mit Hilfe der ersten Strahlableitvorrichtung 5 bzw. mit

Hilfe der zweiten Strahlableinrichtung 35 die jeweilige Eindringtiefe des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 33 eingestellt werden.

In dieser Ausgestaltungsvariante ist das erste
5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 ein Anregungslichtstrahlenbündel 43, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 ein Stimulationsstrahlenbündel 45 ist. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 regt einen ersten schichthaften Probenbereich der Probe 25 an. Das
10 Stimulationslichtstrahlenbündel 45 weist Licht einer Wellenlänge auf, die zum Auslösen einer stimulierten Emission angeregter Probenmoleküle geeignet ist. Die Eindringtiefe des evaneszenten Stimulationsbeleuchtungslichtes ist in dieser Variante geringer als die Eindringtiefe des evaneszenten Anregungsbeleuchtungslichtes. Die erste Lichtquelle 1 ist als gepulster
15 Titansaphirlaser 47 ausgeführt. Die zweite Lichtquelle 31 ist ebenfalls gepulst und beinhaltet einen nicht gezeigten Titansaphirlaser, der einen nicht gezeigten OPO (Optisch parametrischen Oszillator) speist. Die erste Lichtquelle 1 und die zweite Lichtquelle 31 sind derart aufeinander synchronisiert, dass zunächst mit einem Puls des
20 Anregungslichtstrahlenbündels 3 eine Probenanregung erfolgt und anschließend mit dem Licht des Stimulationslichtstrahlenbündels 31 in einer mit der Anregungsschicht überlappenden Probenschicht eine stimulierte Emission ausgelöst wird. Letztlich detektiert werden von dem Detektor 51, der als CCD-Kamera 53 ausgeführt ist, die Fluoreszenzphotonen, die aus dem
25 Anregungsbereich des Anregungslichtstrahlenbündels 3 stammen. Das aus diesem Bereich stammende Detektionslicht 55 gelangt durch das Mikroskopobjektiv 19 zu dem Strahlteiler 15, passiert diesen, um anschließend auf die CCD-Kamera 53 zu treffen.

Fig 2 zeigt eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur
30 Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3, das ein Anregungslichtstrahlenbündel 43 ist, ist zu einem ersten Fokus 23 fokussiert. Nach Durchlaufen des

Mikroskopobjektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Anregungslichtstrahlenbündel das Objektiv als Parallelstrahlenbündel und wird zur evaneszenten Probenbeleuchtung in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33, das ein Stimulationslichtstrahlenbündel 45 ist, wird zu einem zweiten in der Objektivpupillenebene 21 liegenden zweiten Fokus 39 fokussiert. Nach Durchlaufen des Objektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Stimulationslichtstrahlenbündel 45 als Parallelstrahlenbündel. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 verlässt das Objektiv 19 unter einem größeren Winkel zur optischen Achse des Objektivs als das Stimulationslichtstrahlenbündel 45; demgemäss ist die Eindringtiefe des Lichtes des Anregungslichtstrahlenbündels 43 in die Probe 25 größer als die Eindringtiefe des Lichtes des Stimulationslichtstrahlenbündels 45. Der zu dem ersten Fokus 23 des Anregungslichtstrahlenbündels 43 zusammenlaufende Lichtkegel weist einen Öffnungswinkel φ_1 auf, während der zu dem zweiten Fokus 39 zusammenlaufende Lichtkegel des Stimulationslichtstrahlenbündels 45 einen Öffnungswinkel φ_2 aufweist, der kleiner als φ_1 ist; folglich ist der Durchmesser des das Objektiv 19 verlassenden Anregungslichtstrahlenbündels größer als der Durchmesser des das Objektiv 19 verlassenden Stimulationslichtstrahlenbündels 45. Demgemäss ist die von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete axiale Fläche der Probe 25 größer als die von dem Stimulationslichtstrahlenbündel 45 evaneszent beleuchtete Probenfläche. Mit dieser Anordnung ist es möglich, Vergleiche der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in unmittelbarer Nähe des Objektträgers 27 und tiefer gelegener Schichten zu ziehen. Der von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete erste Probenbereich 57 wird von dem Licht des Anregungslichtstrahlenbündels 43 optisch angeregt (schraffiert eingezeichnet). Der von dem Stimulationslichtstrahlenbündel 45 evaneszente zweite Probenbereich 59 ist kleiner als der erste Probenbereich 57 und überlappt zumindest teilweise mit diesem. In diesem zweiten Probenbereich 59 wird eine stimulierte Emission ausgelöst und erst danach die spontan emittierten Photonen mit dem nicht gezeigten (gegateten) Detektor detektiert.

Die detektierten Photonen stammen im wesentlichen aus dem Teil des ersten Probenbereichs 57, der nicht mit dem zweiten Probenbereich 59 überlappt.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
5 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	erste Lichtquelle
	3	erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel
5	5	erste Strahlableinrichtung
	7	kardanisch aufgehängter Drehspegel
	9	erste Optik
	11	zweite Optik
	13	dritte Optik
10	15	Strahlteiler
	17	dichroitischer Strahlteiler
	19	Mikroskopobjektiv
	21	Objektivpupillenebene
	23	Fokus
15	25	Probe
	27	Objektträger
	29	Immersionsmittel
	31	zweite Lichtquelle
	33	zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel
20	35	zweite Strahlableinrichtung
	37	zweiter kardanisch aufgehängter Drehspegel
	39	Fokus
	41	optische Achse
	43	Anregungslichtstrahlenbündel
25	45	Stimulationsstrahlenbündel

Hf

- 47 Titansaphirlaser
- 51 Detektor
- 53 Kamera
- 55 Detektionslicht
- 5 57 erster Probenbereich
- 59 zweiter Probenbereich

Patentansprüche

1. Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten
Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe, dadurch
gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl
5 die Probe evaneszent beleuchtet.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das
Mikroskop ein Objektiv mit einer Objektivpupille aufweist, und dass der erste
Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im
Bereich der Objektivpupille einen Fokus aufweist.
- 10 3. Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein
Einstellmittel vorgesehen ist, mit dem die räumliche Position des Fokus
innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist.
4. Mikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das
Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels
15 angeordnete einstellbare Strahlableinrichtung umfasst.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch
gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus von der optischen Achse des
Objektivs – insbesondere zur Einstellung der Eindringtiefe in die Probe bei
evaneszenter Beleuchtung - einstellbar ist.
- 20 6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste
Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite
Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
- 25 7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein
Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist
und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum
Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem
weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden

Probenbereich, ist.

8. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.
9. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von der optischen Achse.
10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.
11. Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop zumindest eine Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle aufweist und die Wellenlänge bzw. die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Rastermikroskop insbesondere ein konfokales Rastermikroskop ist.
15. Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten:

Hf

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
- Beleuchten der Probe mit dem ersten und dem zweiten Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.

5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtung durch das Objektiv eines Mikroskops erfolgt, wobei der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im Bereich der Objektivpupille des Objektivs einen Fokus aufweist.

10 17. Verfahren nach Anspruch 16, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:

- Einstellen der räumlichen Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls innerhalb der Ebene der Objektivpupille mit einem Einstellmittel.

15 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels angeordnete einstellbare Strahlableitvorrichtung umfasst.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, gekennzeichnet durch den Schritt:

20 • Einstellen der jeweiligen Eindringtiefe in die Probe bei evaneszenter Beleuchtung durch Einstellen des jeweiligen Abstandes des Fokus von der optischen Achse des Objektivs.

25 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.

30 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem

weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.

23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von der optischen Achse.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls eingestellt wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls eingestellt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 26, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:

- Einstellen der Wellenlänge bzw. der Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 27, gekennzeichnet durch die Verwendung eines Mikroskops, insbesondere eines Rastermikroskops oder eines konfokalen Rastermikroskops.

Zusammenfassung

Ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe ist dadurch gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet. Zur CARS-Untersuchung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl sein. Zur Erzielung einer Auflösungssteigerung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungs- und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl sein.

Fig. 1

15

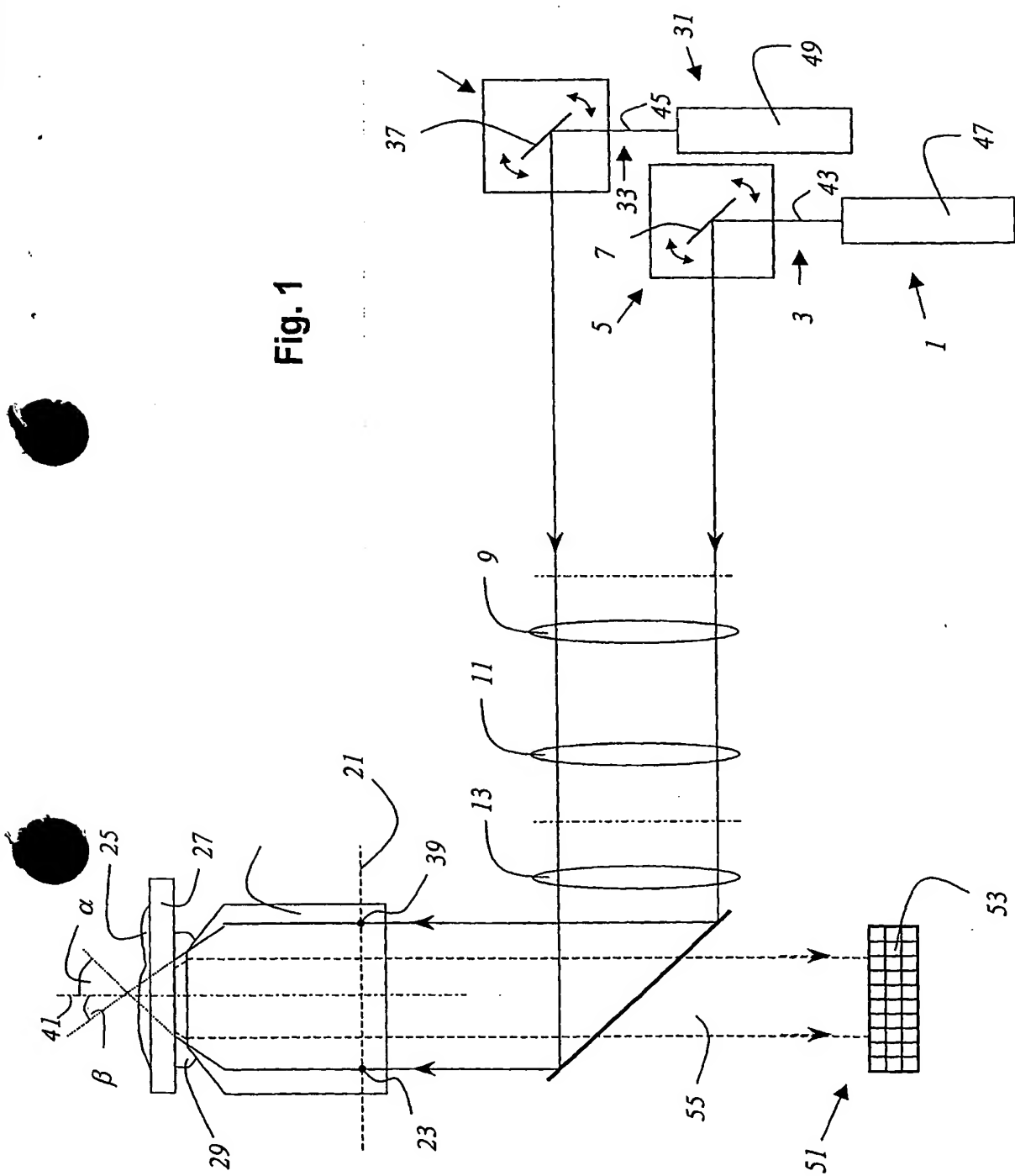


Fig. 1

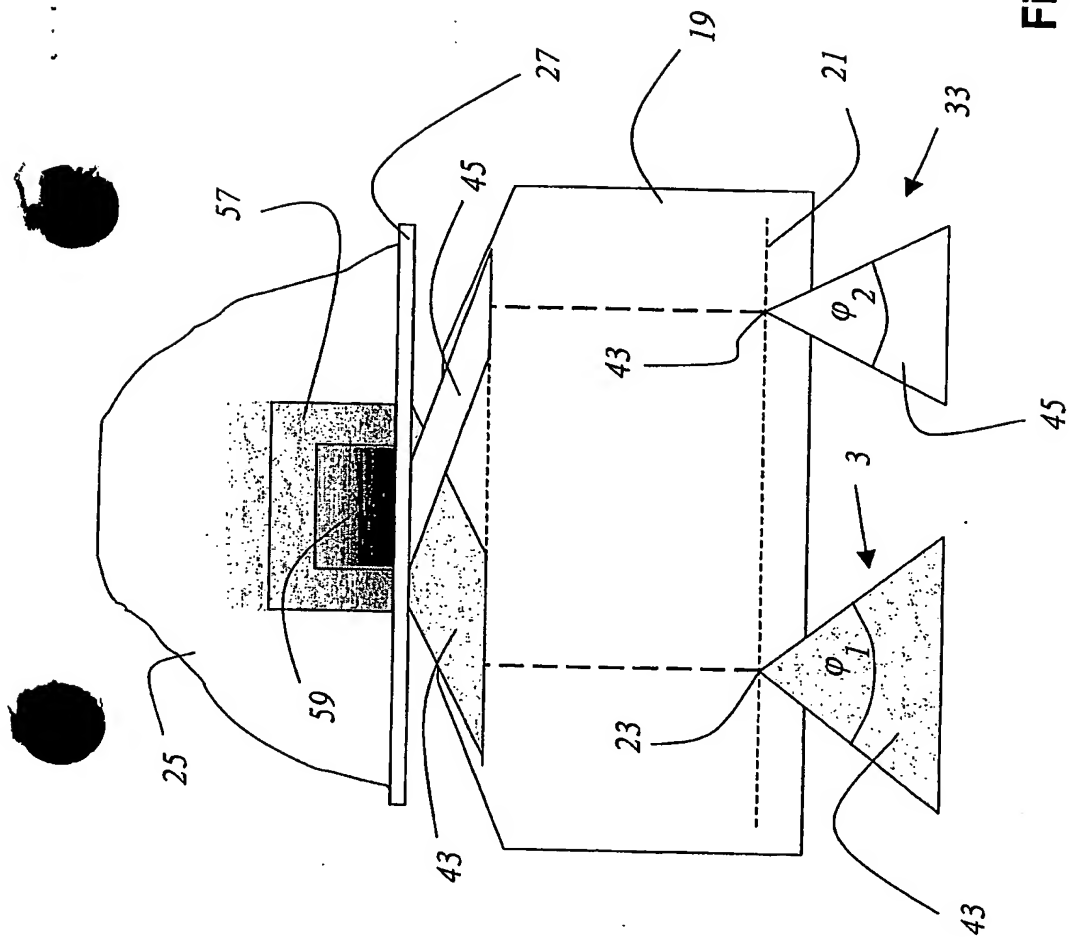


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/052293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHEIM M ET AL: "MULTIPARAMETER EVANESCENT-WAVE IMAGING IN BIOLOGICAL FLUORESCENCE MICROSCOPY" IEEE JOURNAL OF QUANTUM ELECTRONICS, IEEE INC. NEW YORK, US, vol. 38, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 142-148, XP001104420 ISSN: 0018-9197	1,6-15, 20-28
Y	the whole document ----- -/--	2-5, 16-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 2005

Date of mailing of the international search report

14/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Windecker, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/052293

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FLORIAN SCHAPPER, JOSÉ TIAGO GONCALVES, MARTIN OHEIM: "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation" EUROPEAN BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 32, 3 September 2003 (2003-09-03), pages 635-643, XP002315233 cited in the application	1, 15
Y	page 635 - page 637; figures 1A-C -----	2-5, 16-19
X	DE 101 43 481 A1 (EUROPAEISCHES LABORATORIUM FUER MOLEKULARBIOLOGIE) 20 March 2003 (2003-03-20) cited in the application figures paragraph '0044! - paragraph '0077! -----	1-4, 15-18
A	US 4 405 237 A (MANUCCIA ET AL) 20 September 1983 (1983-09-20) cited in the application figure column 2, line 58 - column 4, line 63 -----	6-8, 20-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/052293

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 10143481	A1	20-03-2003	CA	2459363 A1	20-03-2003
			WO	03023483 A2	20-03-2003
			EP	1423746 A2	02-06-2004
			US	2004240046 A1	02-12-2004
<hr/>					
US 4405237	A	20-09-1983	NONE		
<hr/>					

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. März 2005 (31.03.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/029149 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G02B 21/00**
(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2004/052293**
(22) Internationales Anmeldedatum:
23. September 2004 (23.09.2004)
(25) Einreichungssprache: **Deutsch**
(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
(30) Angaben zur Priorität:
103 44 410.6 25. September 2003 (25.09.2003) **DE**
10 2004 044 310.6
10. September 2004 (10.09.2004) **DE**

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ULRICH, Helnrich** [DE/DE]; Langgewann 2, 69121 Heidelberg (DE). **KNEBEL, Werner**; Hebelstrasse 17/1, 76709 Kronau (DE). **MÖLLMANN, Kyra** [DE/DE]; Köhlerweg 10, 67705 Trippstadt (DE). **HOFFMANN, Jürgen**; Weilstrasse 2, 65520 Bad-Camberg (DE).

(74) Anwalt: **REICHERT, Werner F.**; Leica Microsystems AG, Corporate Patents + Trademarks Department, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Weizlar (DE).

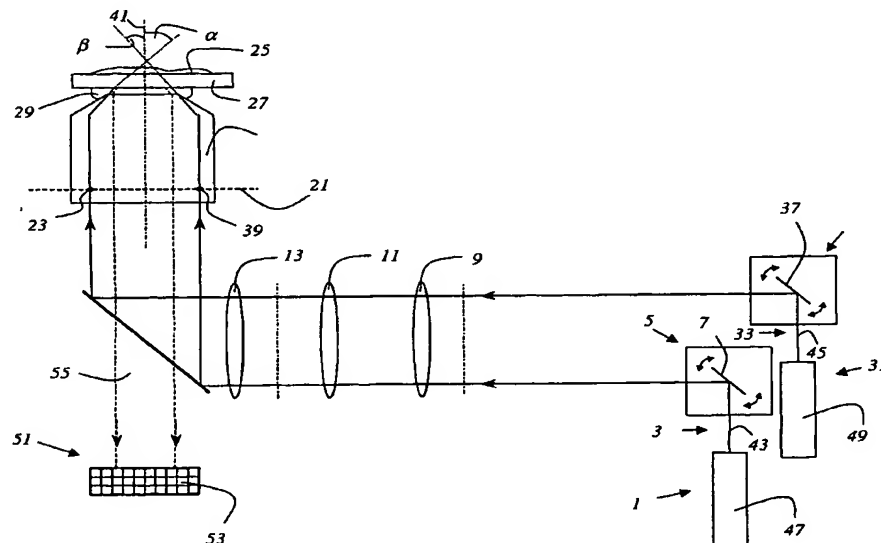
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH** [DE/DE]; Am Friedensplatz 3, 68165 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROSCOPE WITH EVANESCENT WAVE ILLUMINATION

(54) Bezeichnung: MIKROSKOP MIT EVANESZENTER BELEUCHTUNG



(57) Abstract: The invention relates to a microscope with a first and a second illuminating light beam (3, 38), for the illumination of a sample (25), characterised in that the first and/or the second illuminating light beam (3, 33) illuminates the sample (25) with an evanescent wave. For a CARS investigation, the first illuminating light beam can be a pumped light beam (43) and the second illuminating light beam can be a Stokes light beam (45). In order to achieve an increase in resolution, the first illumination light beam can be an excitation beam and the second illuminating light beam can be a stimulating light beam.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

- (57) **Zusammenfassung:** Ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl (3, 38) zum Beleuchten einer Probe (25) ist dadurch gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl (3, 33) die Probe (25) evaneszent beleuchtet. Zur CARS-Untersuchung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl (43) und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl (45) sein. Zur Erzielung einer Auflösungssteigerung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungs- und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl sein.

Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe.

- 5 Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe.

Aus US 2002/0097489 A1 ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung einer Probe bekannt. Das Mikroskop beinhaltet eine Weißlichtquelle, deren Licht über eine Schlitzblende durch das Mikroskopobjektiv hindurch in den

10 eine Probe tragenden Objektträger zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt wird. Das Beleuchtungslicht pflanzt sich in dem Objektträger durch totalinterne Reflektion fort, wobei die Beleuchtung der Probe nur im Bereich des aus dem Objektträger herausragenden evaneszenten Feldes erfolgt. Mikroskope dieser Art sind unter dem Begriff TIRFM (Total Internal

15 Reflection Fluorescent Microscope) bekannt.

Die z-Auflösung von TIRF-Mikroskopen ist aufgrund des nur ca. 100 nm in die Probe ragenden evaneszenten Feldes außerordentlich gut.

Aus DE 101 08 796 A1 ist ein hochaperturiges Objektiv, insbesondere für TIRF-Anwendungen bekannt. Das Objektiv besteht aus einer ersten Linse mit

einer positiven Brechkraft, einer zweiten Linse mit negativer Brechkraft, wobei das Brennweitenverhältnis zwischen den beiden Linsen im Bereich von - 0,4 und - 0,1 liegt und die Gesamtbrechkraft größer Null ist. Ferner beinhaltet das Objektiv zwei positive Linsen, deren Verhältnisdurchmesser zur Brennweite
5 größer 0,3 und kleiner 0,6 ist. Ferner beinhaltet das Objektiv eine Negativlinse und einer Sammellinse, wobei die Negativlinse der Frontgruppe zugewandt ist und das Brennweitenverhältnis der Negativlinse und der Sammellinse zwischen - 0,5 und - 2 liegt.

Aus DE 102 17 098 A1 ist eine Auflichtbeleuchtungsanordnung für die TIRF-
10 Mikroskopie bekannt. Die Auflichtbeleuchtungsanordnung beinhaltet eine Beleuchtungsquelle, die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlenbündel abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse propagiert und eine Umlenkeinrichtung, die das Beleuchtungsstrahlenbündel umlenkt und parallel zur optischen Achse in das
15 Objektiv einkoppelt. Es ist bei dieser Auflichtbeleuchtungsanordnung vorgesehen, dass das von der Beleuchtungsquelle abgegebene Beleuchtungsstrahlenbündel s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer Phasendifferenz aufweist und die Umlenkeinrichtung das Beleuchtungsstrahlenbündel x-mal reflektiert, wobei $x = (n \times 180^\circ - d)/60^\circ$.

20 Aus DE 101 43 481 A1 ist ein Mikroskop zur TIRM (Total Internal Reflection Microscopy) bekannt. Das Mikroskop weist ein Mikroskopgehäuse und ein Objektiv auf. Das von einer Beleuchtungseinrichtung ausgehende Beleuchtungslicht kann über einen in das Mikroskopgehäuse einschiebbaren Adapter eingekoppelt werden.

25 Aus US 2004/0001253 A1 ist ein Mikroskop mit einem optischen Beleuchtungssystem, das ein einfaches Umschalten zwischen evaneszenter Beleuchtung und Reflektionsbeleuchtung ermöglicht. Das Beleuchtungssystem beinhaltet eine Laserlichtquelle, deren Licht in eine optische Faser eingekoppelt wird. Ferner ist eine Auskoppeloptik vorgesehen,
30 die das aus der Faser austretende Licht in einen hinteren Brennpunkt des Mikroskopobjektivs fokussiert. Die optische Faser ist in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs verschiebbar.

Aus DE 102 29 935 A1 ist eine Einrichtung zur Einkopplung von Licht in einem Mikroskop bekannt. Dabei wird in der Leuchtfeldblendenebene durch eine als Schieber ausgeführte Lichtleitfaser-Einkopplung Laserlicht auf das Präparat
5 gerichtet. Die Erfindung ist insbesondere für das TIRF-Verfahren geeignet.

In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahlenbündels wird mit Hilfe einer steuerbaren
10 Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt
15 kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.

20 Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende - fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw.
25 Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird
30 Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch

sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

- 5 Anordnungen, die das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Anregungslichtstrahls gegeben. Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/DE/95/00124 bekannt. Hierbei
10 werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert
15 wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

- Beispielsweise aus US 2002/0167724 A1 und aus US 6,667,830 B1 ist eine
20 Variante der STED-Technik bekannt, bei der die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche mit dem Licht des zweiten Lasers zunächst weiter – nämlich in einen dritten Zustand – angeregt werden. Bei dieser Variante, für die sich auch der Begriff „up-conversion“ eingebürgert hat, wird äquivalent zu der Variante der direkten stimulierten Abregung in den Grundzustand eine
25 Auflösungssteigerung erzielt.

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)-Mikroskopie ist eine Technik, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein großer Vorteil ist, dass die Proben nicht mit Farbstoffen markiert werden müssen. Außerdem können lebende Zellen untersucht werden.

- 30 Im Vergleich zur herkömmlichen Raman-Mikroskopie und der bekannten konfokalen Raman-Mikroskopie kann man bei der CARS-Mikroskopie eine

höhere Ausbeute an Detektionslicht erzielen, störende Nebeneffekte besser unterdrücken und das Detektionslicht leichter vom Beleuchtungslicht trennen. Für die konventionelle konfokale Raman-Spektroskopie wird ein Detektionspinhole benötigt, um eine gute axiale Auflösung zu erreichen, sowie
5 ein hochauflösendes Spektrometer. CARS dagegen ist ein nichtlinearer optischer Prozess (Vierwellen-Mischprozess). Ähnlich, wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie, bei der zwei oder mehr Photonen gleichzeitig absorbiert werden, wird, da die Wahrscheinlichkeit des Phasenrichtigen gleichzeitigen Zusammentreffens mehrerer Photonen im Fokus auf Grund der
10 höheren Photonendichte am größten ist, kein Detektionspinhole benötigt. Ohne Detektionspinhole wird die gleiche axiale Auflösung erzielt wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie. Für die CARS-Spektroskopie werden üblicherweise 2 Laser, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren (ν_P und ν_S , Pump- und Stokeslaser), benutzt, wobei ν_S durchstimmbar sein sollte,
15 um ein CARS-Spektrum ν_{CARS} zu erzeugen ($\nu_{CARS} = 2\nu_P - \nu_S$, $I_{CARS} \sim (I_P)^2 \cdot I_S$). Stimmt die Differenzfrequenz $\nu_P - \nu_S$ mit der Differenzfrequenz zwischen zwei molekularen Vibrationszuständen $|1\rangle$ und $|0\rangle$ in der Probe überein, so ist das CARS-Signal sogar noch verstärkt. Der Pumplichtstrahl und der Stokeslichtstrahl werden bei mikroskopischen Anwendungen koaxial
20 vereinigt und gemeinsam auf dasselbe Probenvolumen fokussiert. Die Richtung, in der die Anti-Stokes-Strahlung emittiert wird, ergibt sich aus der Phasenanpassungsbedingung für den Vier-Wellen-Mischprozess.

Aus der US-Patentschrift 4,405,237 „Coherent anti-Stokes Raman device“ ist eine Vorrichtung bekannt, bei der zwei gepulste Laserstrahlen, die von zwei
25 Lasern erzeugt werden und die unterschiedliche Wellenlängen im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich des Spektrums aufweisen, genutzt werden, um eine Probe simultan zu beleuchten. Bei geeigneter Wahl der Wellenlängen kann die Probe derart angeregt werden, dass sie die charakteristische Coherent anti-Stokes Raman-Strahlung emittiert.

30 Aus James W.M. Chon, Min Gu, „Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: Image

formation", Appl. Opt. 43, 1063-1071, 2004 und aus Florian Schapper, José T. Gonçalves, Martin Oheim, "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation", Eur. Biophys. J. 32, 635-643, 2003 ist bekannt eine evaneszent beleuchtete Probe über einen
5 Zweiphotonenprozess anzuregen.

Die bislang bekannten Techniken zur evaneszenten Probenbeleuchtung erlauben lediglich die Probenschichten zu untersuchen, die direkt an das Deckglas bzw. direkt an den Objektträger angrenzen.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Mikroskop anzugeben, das
10 eine weitgehend flexible Probenuntersuchung, insbesondere auch der Bereiche, die nicht unmittelbar an das Deckglas oder an den Objektträger angrenzen, zu ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch ein Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe
15 evaneszent beleuchtet.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur - insbesondere rastermikroskopischen - Untersuchung einer Probe anzugeben, die weitgehend flexibel ist und sich nicht auf die Probenschichten beschränkt, die unmittelbar an das Deckglas bzw. an den Objektträger angrenzen.

20 Die weitere Aufgabe wird durch ein Verfahren zur - insbesondere mikroskopischen - Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten gelöst:

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
- Beleuchten der Probe mit dem ersten und dem zweiten Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste
25 Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante weist das Mikroskop ein Objektiv mit einer Objektivpupille auf, wobei der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel im Bereich der Objektivpupille einen Fokus
30 aufweist. Vorzugsweise ist ein Einstellmittel vorgesehen, mit dem die

räumliche Position des Fokus innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist. Das Einstellmittel kann beispielsweise eine Strahlableitvorrichtung mit mehreren Dreh- oder Kippspiegeln oder mit einem kardanisch aufgehängten Spiegel umfassen. Das Einstellmittel kann auch als

5 akustooptisches Element ausgebildet sein oder Mikrospiegel beinhalten. Zum Einstellen der räumlichen Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels kann auch eine verschiebbare Lichtleitfaser dienen.

Der Winkel bezüglich der optischen Achse des Objektivs, unter dem der zur

10 evaneszenten Beleuchtung der Probe vorgesehene Beleuchtungslichtstrahlenbündel das Objektiv verlässt, hängt von der räumlichen Position des Fokus in der Objektivpupille ab. Der Winkel ist umso größer, je größer der Abstand des jeweiligen Fokus von der optischen Achse ist. Daher ist erfindungsgemäß insbesondere der Abstand des Fokus von der

15 optischen Achse des Objektivs zur Einstellung des Winkels und damit zur Einstellung der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe einstellbar.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist um eine CARS-Untersuchung einer Probe zu realisieren.

20 Der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Stokeslichtstrahl.

In einer anderen, ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist insbesondere zur Erzielung einer hohen Ortsauflösung das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein

25 Anregungslichtstrahlenbündel zur optischen Anregung eines ersten Probenbereichs und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein Stimulationslichtstrahlenbündel zum Auslösen einer stimulierten Emission oder zum Auslösen einer weiteren Anregung, wobei die stimulierte Emission und/oder die weitere Anregung in einem weiteren zumindest teilweise mit dem

30 ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich stattfindet.

Besonders bevorzugt ist eine Variante, bei der das

Anregungslichtstrahlenbündel und das Stimulationslichtstrahlenbündel beide die Probe evaneszent beleuchten, wobei das Anregungslichtstrahlenbündel eine größere Eindringtiefe aufweist als das Stimulationslichtstrahlenbündel. Um dies zu realisieren, wird der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahlenbündels in der Objektivpupille von der optischen Achse des Objektivs größer gewählt, als der Abstand des Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels in der Objektivpupille von der optischen Achse. Durch den relativ tiefer eindringenden Anregungslichtstrahlenbündel wird die Probe in einer an das Deckglas bzw. an den Objektträger angrenzenden relativ breiten Schicht optisch angeregt und durch den Stimulationslichtstrahl in einer relativ schmalen, an den Objektträger bzw. an das Deckglas angrenzenden –mit der ersten Schicht überlappenden– Schicht stimuliert, optisch abgeregt, so dass letztlich weitgehend ausschließlich Fluoreszenzphotonen aus dem Teil der mit dem Anregungslichtstrahlenbündel beleuchteten Schicht detektiert werden, die nicht von dem Stimulationslichtstrahlenbündel beleuchteten Schicht räumlich überlagert ist.

In einer anderen erfindungsgemäßen Variante wird die Probe von dem Anregungslichtstrahlenbündel evaneszent beleuchtet und von dem direkt beleuchteten Stimulationslichtstrahlenbündel optisch stimuliert abgeregt. Das Stimulationslichtstrahlenbündel ist hierbei vorzugsweise derart manipuliert, dass der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels innen hohl ausgebildet ist. Ein Hohlfokus ist beispielsweise mit Hilfe von Phasenfiltern, die in einer zur Fokalebene des Objektivs konjugierten Ebene (Fourierebene) angeordnet sind. Als Phasenfilter kann beispielsweise eine $\lambda/2$ -Platte fungieren, die von dem Stimulationslichtstrahl überleuchtet wird, so dass nur der innere Teilbereich des Stimulationslichtstrahlenbündels durch die $\lambda/2$ -Platte verläuft, während der äußere Ring an der $\lambda/2$ -Platte vorbei verläuft. Letztlich werden die Fluoreszenzphotonen detektiert, die aus dem vom Anregungslichtstrahlenbündel evaneszent beleuchteten Teilbereich der Probe stammen, der im inneren des Hohlfokus des Stimulationslichtstrahlenbündels liegt. Auf diese Weise kann eine Abrasterung der Probe mit einer sehr hohen Ortsauflösung erfolgen. In z-Richtung ist die Ortsauflösung durch die

Eindringtiefe des evaneszent beleuchteten Anregungslichtstrahls gegeben (z.B. 100 nm), während in den axialen Richtungen das Auflösungsvermögen durch die Abmessungen des Hohlfokus bestimmt sind. Zum Abrastern der Probe wird der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels vorzugsweise mit
5 einer Strahlableitvorrichtung, vorzugsweise mäanderförmig über bzw. durch die Probe geführt.

In einer besonderen Ausgestaltungsvariante erfolgt durch das Stimulationslichtstrahlenbündel eine weitere Anregung der bereits angeregten Probenbereiche in einem dritten Anregungszustand. Auch diese Variante ist
10 geeignet, um eine hohe Ortsauflösung zu erzielen.

Vorzugsweise ist das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst. Hierzu kann beispielsweise zumindest eine gepulste Lichtquelle, wie ein modernverkuppelter Puls laser (z.B. Titansaphirlaser) vorgesehen sein. Auch
15 die Verwendung von gepulsten Halbleiterlasern oder von regenerativen Verstärkern ist beispielsweise möglich.

Von besonderem Vorteil ist eine Ausgestaltungsform, bei der das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst sind, wobei der zeitliche
20 Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. In dieser Variante können beispielsweise zwei Lichtquellen aufeinander synchronisiert sein, wobei der zeitliche Abstand der Pulse durch einstellbare Verzögerungsstrecken einstellbar ist. In einer anderen Variante kann auch das
25 Licht des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und das Licht des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels von einer einzigen Lichtquelle entstammen, die einen aufzuteilenden Primärlichtstrahl emittiert, wobei vorgesehen sein kann, dass in den aufgeteilten Lichtzweigen eine Wellenlängenveränderung (OPO; mikrostrukturierte Faser; Frequenzvervielfachung) oder eine
30 Leistungsveränderung (z.B. Verstärker oder Abschwächer) erfolgt.

Das erfindungsgemäße Mikroskop weist vorzugsweise zumindest eine

Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle auf. Vorzugsweise sind die Wellenlängen bzw. ist die Wellenlänge des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar. Es ist erfindungsgemäß

5 möglich, dass der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und auch der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel Licht einer oder mehrerer Wellenlängen beinhalten kann, wobei sich die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels voneinander unterscheiden können.

10 In einer besonders bevorzugten Variante ist der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Öffnungswinkel des zu einem in der Objektivpupille liegenden Fokus zusammenlaufenden Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. Durch

15 Änderung des Öffnungswinkels bei der Fokussierung in die Objektivpupille ändert sich die Größe der Fläche, die evaneszent beleuchtet wird. Wählt man die Fläche der durch den Stimulationslichtstrahl evaneszent beleuchteten Fläche so, dass sie kleiner ist als die von dem evaneszent anregenden Beleuchtungslichtstrahlenbündel beleuchtete Fläche, so kann man einen

20 direkten Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in unmittelbarer Nähe der Objektträgeroberfläche zu den Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in tiefergelegenen Schichten erhalten.

Bei einer vorteilhaften Variante wird die Probe mit einer evaneszenten

25 Anregungs-Beleuchtung mit einer relativ hohen Eindringtiefe beleuchtet werden. Mit einer evaneszenten STED-Beleuchtung (Stimulationslichtstrahlenbündel), die eine geringe Eindringtiefe aufweist (größerer Eintrittswinkel in den Objektträger), wird eine Fluoreszenz direkt am Objektträger stimuliert abgeregt. Die Aufnahme des Fluoreszenzbildes erfolgt

30 zeitlich später (time-gated CCD), so dass nur Fluoreszenzphotonen aus tiefer liegenden Probenschichten detektiert werden. Die Einstellung der jeweiligen Tiefen sind sogar einstellbar, indem die radialen Positionen der beiden

Beleuchtungslichtfokusse in der Objektivpupille variiert werden. Die Beleuchtungslichtintensität in der Probe nimmt bei TIRF exponentiell mit der Eindringtiefe ab. Umso effektiver ist der STED-Effekt direkt an der Objektträgeroberfläche, so dass z.B. Probenschichten ab 100nm Tiefe
5 vermessen werden können.

Vorzugsweise sind vor dem Detektor (beispielsweise Multibanddetektor), der beispielsweise als Kamera ausgestaltet sein kann, Bandpassfilter und/oder Kantenfilter angeordnet auf die jeweilige Emissionsbandbreite des
Fluoreszenzsignals durch abgestimmt sind. Zur Farbselektion kann ein
10 dispersives Element vorgesehen sein, dass eine spektrale Aufspaltung erzeugt, aus der die zu detektierenden Wellenlängenanteile ausgeblendet werden. Der Detektor kann auch als Farbdetektor, beispielsweise als Farbkamera ausgestaltet sein. Genauso ist es möglich, dass ein dispersives Element das Detektionslicht auf mehrere Detektoren aufteilt, um eine
15 Spektraldetektion zu erreichen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Mikroskop ein Rastermikroskop; insbesondere ein konfokales Rastermikroskop.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und
20 wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 Ein erfindungsgemäßes Mikroskop und

Fig. 2 Eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur Erläuterung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.

25

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Mikroskop mit einer ersten Lichtquelle 1, die ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 erzeugt. Das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel gelangt zu einer ersten Strahlableitvorrichtung 5, die einen kardanischn aufgehängten Drehspegel 7
30 beinhaltet und wird von dieser Strahlableitvorrichtung zu einer ersten Optik 9,

einer zweiten Optik 11 und einer dritten Optik 13 geführt und von einem Strahlteiler 15, der als dichroitischer Strahlteiler 17 ausgeführt ist, zu dem Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das Mikroskopobjektiv 19 weist eine hintere Brennebene (Objektivpupillenebene 21) auf. Das erste
5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 weist in der Objektivpupillenebene 21 einen als Punkt dargestellten Fokus 23 auf. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 wird zur evaneszenten Beleuchtung der Probe 25 in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Zwischen dem Objektträger und dem Objektiv 19 befindet sich ein Immersionsmittel 29. Das Mikroskop
10 weist eine zweite Lichtquelle 31, die ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 emittiert auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 gelangt über eine zweite Strahlableinrichtung 35, die einen zweiten kardanisch aufgehängten Drehspiegel 37 beinhaltet, zur ersten Optik 9, zur zweiten Optik 11 und zur
15 dritten Optik 13 und wird von dem Strahlteiler 15 zum Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 weist in der Objektivpupillenebene einen Fokus 39 auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 wird ebenfalls zur evaneszenten Probenbeleuchtung in den Objektträger 27 eingekoppelt. Das erste
20 Beleuchtungslichtstrahlenbündel verlässt das Mikroskopobjektiv 19 unter einem Winkel α zur optischen Achse 41 des Objektivs 19, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 das Objektiv 19 unter einem Winkel β verlässt. Der Winkel α ist durch Verändern des Abstandes des ersten Fokus 23, des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 zur optischen Achse 41
25 des Objektivs 19 einstellbar. Analog ist der Winkel β durch Verändern des Abstandes des zweiten Fokus 39 von der optischen Achse 41 einstellbar. Die Einstellung der Position des ersten Fokus 23 und des zweiten Fokus 39 erfolgt mit Hilfe der ersten Strahlableinrichtung 5 bzw. mit Hilfe der zweiten Strahlableinrichtung 35, die vorzugsweise jeweils in einer zur
30 Objektivpupillenebene 21 korrespondierenden Ebene angeordnet sind. Da die Eindringtiefe der evaneszenten Beleuchtung direkt vom Winkel α bzw. vom Winkel β abhängt, kann mit Hilfe der ersten Strahlableinrichtung 5 bzw. mit

Hilfe der zweiten Strahlableinrichtung 35 die jeweilige Eindringtiefe des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 33 eingestellt werden.

In dieser Ausgestaltungsvariante ist das erste
5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 ein Anregungslichtstrahlenbündel 43, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 ein Stimulationsstrahlenbündel 45 ist. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 regt einen ersten schichthaften Probenbereich der Probe 25 an. Das
10 Stimulationslichtstrahlenbündel 45 weist Licht einer Wellenlänge auf, die zum Auslösen einer stimulierten Emission angeregter Probenmoleküle geeignet ist. Die Eindringtiefe des evaneszenten Stimulationsbeleuchtungslichtes ist in dieser Variante geringer als die Eindringtiefe des evaneszenten Anregungsbeleuchtungslichtes. Die erste Lichtquelle 1 ist als gepulster
15 Titansaphirlaser 47 ausgeführt. Die zweite Lichtquelle 31 ist ebenfalls gepulst und beinhaltet einen nicht gezeigten Titansaphirlaser, der einen nicht gezeigten OPO (Optisch parametrischen Oszillator) speist. Die erste Lichtquelle 1 und die zweite Lichtquelle 31 sind derart aufeinander
20 synchronisiert, dass zunächst mit einem Puls des Anregungslichtstrahlenbündels 3 eine Probenanregung erfolgt und anschließend mit dem Licht des Stimulationslichtstrahlenbündels 31 in einer mit der Anregungsschicht überlappenden Probenschicht eine stimulierte Emission ausgelöst wird. Letztlich detektiert werden von dem Detektor 51, der als CCD-Kamera 53 ausgeführt ist, die Fluoreszenzphotonen, die aus dem
25 Anregungsbereich des Anregungslichtstrahlenbündels 3 stammen. Das aus diesem Bereich stammende Detektionslicht 55 gelangt durch das Mikroskopobjektiv 19 zu dem Strahlteiler 15, passiert diesen, um anschließend auf die CCD-Kamera 53 zu treffen.

Fig 2 zeigt eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur
30 Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3, das ein Anregungslichtstrahlenbündel 43 ist, ist zu einem ersten Fokus 23 fokussiert. Nach Durchlaufen des

Mikroskopobjektiv 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Anregungslichtstrahlenbündel das Objektiv als Parallelstrahlenbündel und wird zur evaneszenten Probenbeleuchtung in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33, das ein

5 Stimationslichtstrahlenbündel 45 ist, wird zu einem zweiten in der Objektivpupillenebene 21 liegenden zweiten Fokus 39 fokussiert. Nach Durchlaufen des Objektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Stimationslichtstrahlenbündel 45 als Parallelstrahlenbündel. Das

10 Anregungslichtstrahlenbündel 43 verlässt das Objektiv 19 unter einem größeren Winkel zur optischen Achse des Objektivs als das Stimationslichtstrahlenbündel 45; demgemäss ist die Eindringtiefe des Lichtes des Anregungslichtstrahlenbündels 43 in die Probe 25 größer als die Eindringtiefe des Lichtes des Stimationslichtstrahlenbündels 45. Der zu dem

15 ersten Fokus 23 des Anregungslichtstrahlenbündels 43 zusammenlaufende Lichtkegel weist einen Öffnungswinkel φ_1 auf, während der zu dem zweiten Fokus 39 zusammenlaufende Lichtkegel des Stimationslichtstrahlenbündels 45 einen Öffnungswinkel φ_2 aufweist, der kleiner als φ_1 ist; folglich ist der Durchmesser des das Objektiv 19 verlassenden

20 Anregungslichtstrahlenbündels größer als der Durchmesser des das Objektiv 19 verlassenden Stimationslichtstrahlenbündels 45. Demgemäss ist die von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete axiale Fläche der Probe 25 größer als die von dem Stimationslichtstrahlenbündel 45 evaneszent beleuchtete Probenfläche. Mit dieser Anordnung ist es möglich, Vergleiche der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in

25 unmittelbarer Nähe des Objektträgers 27 und tiefer gelegener Schichten zu ziehen. Der von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete erste Probenbereich 57 wird von dem Licht des Anregungslichtstrahlenbündels 43 optisch angeregt (schraffiert eingezeichnet). Der von dem Stimationslichtstrahlenbündel 45 evaneszente

30 zweite Probenbereich 59 ist kleiner als der erste Probenbereich 57 und überlappt zumindest teilweise mit diesem. In diesem zweiten Probenbereich 59 wird eine stimulierte Emission ausgelöst und erst danach die spontan emittierten Photonen mit dem nicht gezeigten (gegateten) Detektor detektiert.

Die detektierten Photonen stammen im wesentlichen aus dem Teil des ersten Probenbereichs 57, der nicht mit dem zweiten Probenbereich 59 überlappt.

- Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
- 5 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	erste Lichtquelle
	3	erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel
5	5	erste Strahlableinrichtung
	7	kardanisch aufgehängter Drehspiegel
	9	erste Optik
	11	zweite Optik
	13	dritte Optik
10	15	Strahlteiler
	17	dichroitischer Strahlteiler
	19	Mikroskopobjektiv
	21	Objektivpupillenebene
	23	Fokus
15	25	Probe
	27	Objektträger
	29	Immersionsmittel
	31	zweite Lichtquelle
	33	zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel
20	35	zweite Strahlableinrichtung
	37	zweiter kardanisch aufgehängter Drehspiegel
	39	Fokus
	41	optische Achse
	43	Anregungslichtstrahlenbündel
25	45	Stimulationsstrahlenbündel

- 47 Titansaphirlaser
- 51 Detektor
- 53 Kamera
- 55 Detektionslicht
- 5 57 erster Probenbereich
- 59 zweiter Probenbereich

Patentansprüche

1. Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Objektiv mit einer Objektivpupille aufweist, und dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im Bereich der Objektivpupille einen Fokus aufweist.
3. Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Einstellmittel vorgesehen ist, mit dem die räumliche Position des Fokus innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist.
4. Mikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels angeordnete einstellbare Strahlableinrichtung umfasst.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus von der optischen Achse des Objektivs – insbesondere zur Einstellung der Eindringtiefe in die Probe bei evaneszenter Beleuchtung - einstellbar ist.
6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden

Probenbereich, ist.

8. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.
9. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von der optischen Achse.
10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.
11. Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop zumindest eine Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle aufweist und die Wellenlänge bzw. die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Rastermikroskop insbesondere ein konfokales Rastermikroskop ist.
15. Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen – Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten:

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
 - Beleuchten der Probe mit dem ersten und dem zweiten Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtung durch das Objektiv eines Mikroskops erfolgt, wobei der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im Bereich der Objektivpupille des Objektivs einen Fokus aufweist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, gekennzeichnet durch den weiteren
- 10 Schritt:
- Einstellen der räumlichen Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls innerhalb der Ebene der Objektivpupille mit einem Einstellmittel.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das
- 15 Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels angeordnete einstellbare Strahlableitvorrichtung umfasst.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, gekennzeichnet durch den Schritt:
- Einstellen der jeweiligen Eindringtiefe in die Probe bei evaneszenter
- 20 Beleuchtung durch Einstellen des jeweiligen Abstandes des Fokus von der optischen Achse des Objektivs.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite
- 25 Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum
- 30 Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem

weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent
5 beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.

23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von
10 der optischen Achse.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der
15 erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls eingestellt wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch
20 gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls eingestellt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 26, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:

• Einstellen der Wellenlänge bzw. der Wellenlängen des ersten
25 Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 27, gekennzeichnet durch die Verwendung eines Mikroskops, insbesondere eines Rastermikroskops oder eines konfokalen Rastermikroskops.

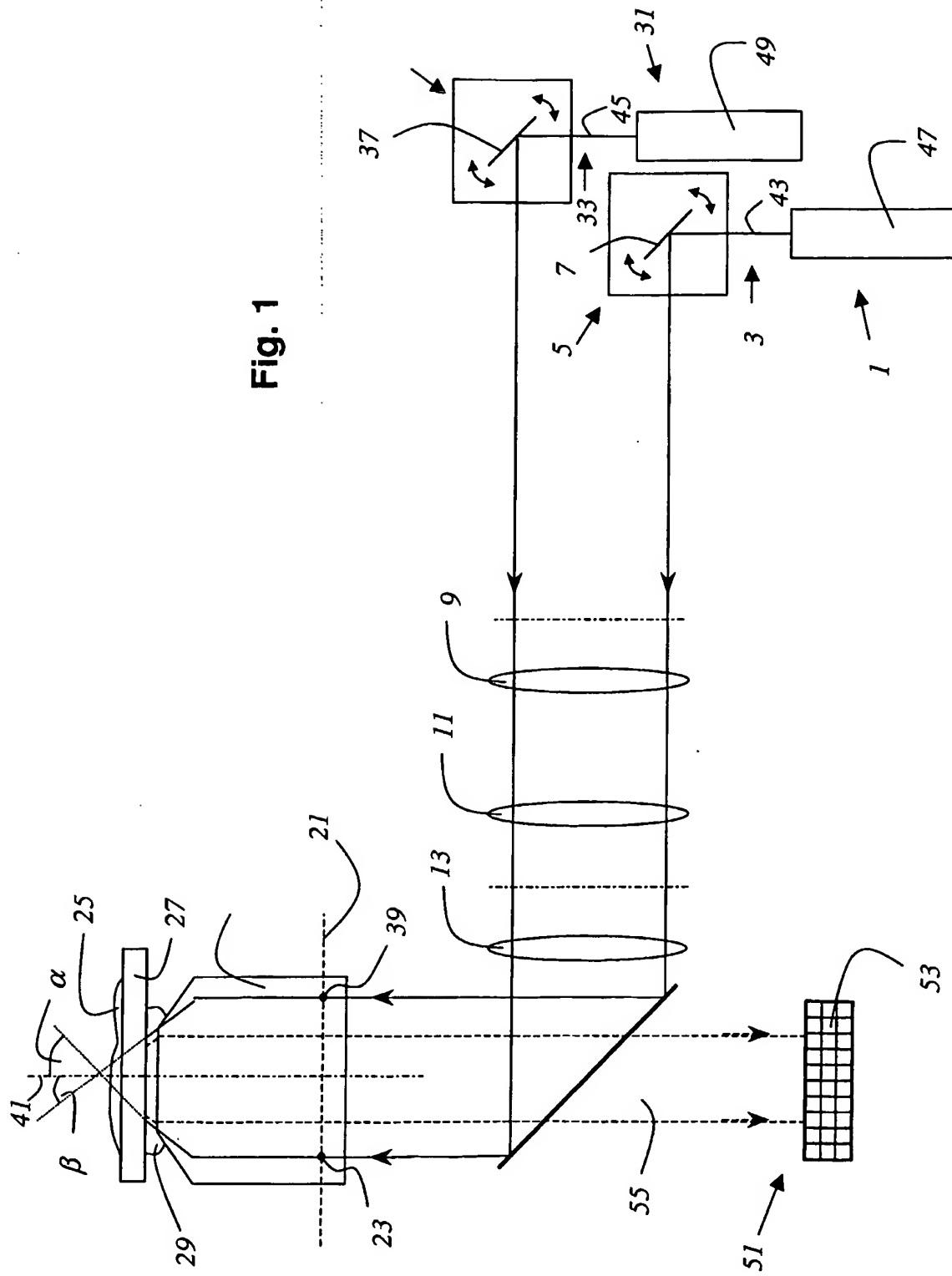


Fig. 1

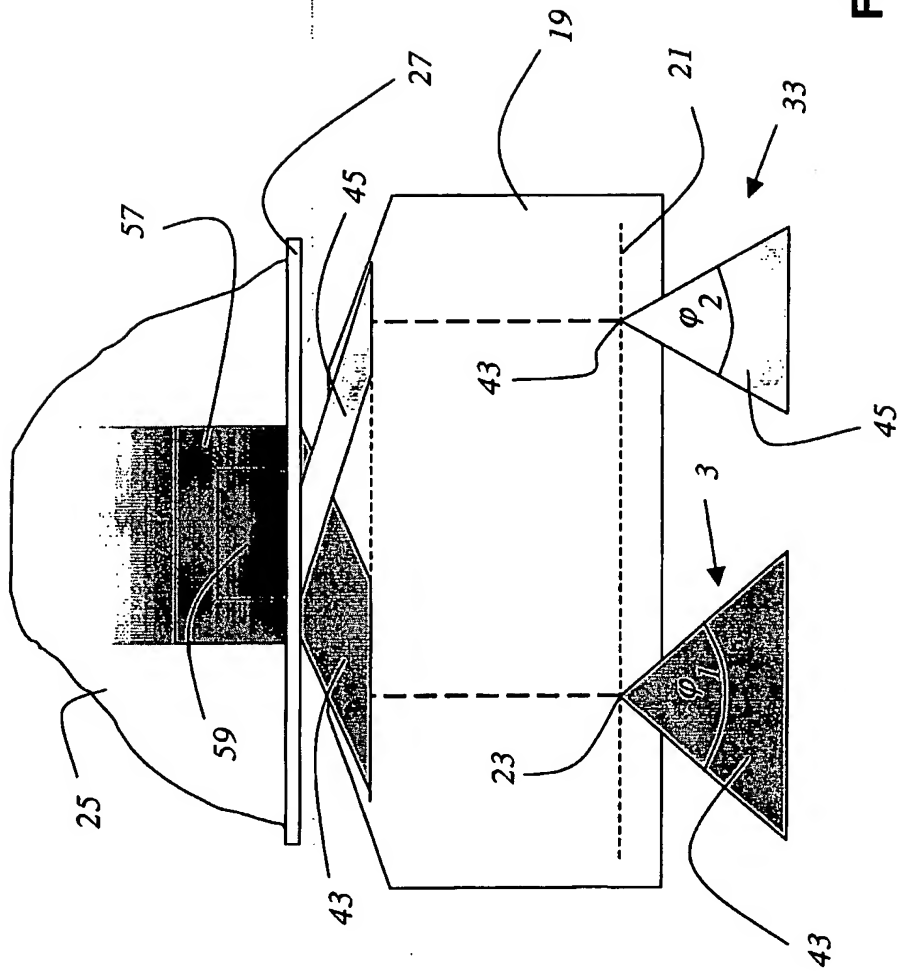


Fig. 2